

Hyaluronan-Export
über die Plasmamembran
durch die ABC-Transporter MRP5 und CFTR
(*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*)

Dissertation
zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
an der Universität Bielefeld

vorgelegt von
Tobias Schulz
aus Bielefeld

Bielefeld / Münster

Juni 2007

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von

Prof. Dr. rer. nat. Peter Prehm

am

Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie

Universitätsklinikum Münster

in der Zeit von

Oktober 2003 bis Juni 2007

1. Gutachter: Prof. Dr. N. Sewald

2. Gutachter: Prof. Dr. P. Prehm

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2007

Die Natur ergreift immer die Partei des versteckten Fehlers

(Edward A. Murphy)

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Tobias Schulz, Udo Schumacher, and Peter Prehm

Hyaluronan export by the ABC-transporter MRP5 and its modulation by intracellular cGMP

J. Biol. Chem. *in press*.

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	2
2.1 Aufbau und Synthese von Hyaluronan	2
2.2 Biologische Funktion von Hyaluronan	5
2.3 ABC-Transporter	7
2.4 Zystische Fibrose und CFTR	9
2.5 Stickstoffmonoxid und die cGMP-Signalkaskade	11
3 Zielsetzung	14
4 Material und Methoden	15
4.1 Material	15
4.1.1 Zelllinien	15
4.1.2 Reagenzien für die Zellkultur	15
4.1.3 Bakterienstämme und Nährmedien	15
4.1.4 Standardlösungen und Puffer	16
4.1.5 Antikörper	16
4.1.6 Oligonukleotide und siRNA	17
4.1.7 Inhibitoren und Aktivatoren	18
4.1.8 Reagenziensätze	18
4.1.9 Chemikalien	18
4.1.10 Geräte	19
4.2 Methoden	21
4.2.1 Zellkultur	21
4.2.1.1 Zellkulturbedingungen	21
4.2.1.2 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen	21
4.2.1.3 Zelllinien	21
4.2.2 Molekularbiologische Methoden	23
4.2.2.1 Herstellung chemisch-kompetenter Escherichia coli-Zellen	23
4.2.2.2 Transformation von E. coli	23
4.2.2.3 Plasmidisolierung aus E. coli	23
4.2.2.4 RNA-Isolierung	24
4.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	24
4.2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)	24
4.2.2.7 Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)	25
4.2.2.8 Real-Time PCR	26

4.2.2.9 Agarosegelelektrophorese	27
4.2.2.10 Reinigung von PCR-Produkten aus Agarosegele.....	27
4.2.2.11 TOPO TA-Klonierung.....	28
4.2.2.12 Sequenzierung	28
4.2.2.13 Knock-down von Genen durch siRNA	29
4.2.3 Proteinbiochemische Methoden	30
4.2.3.1 Solubilisierung von Membranproteinen.....	30
4.2.3.2 Quantitative Proteinbestimmung.....	30
4.2.3.3 Methanol-Chloroform-Fällung.....	31
4.2.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacryamid-Gelelektrophorese.....	31
4.2.3.5 Coomassie-Färbung.....	32
4.2.3.6 Western-Blot	32
4.2.3.7 Hyaluronan-Assay	33
4.2.3.8 Hyaluronan-Synthase-Assay	34
4.2.3.9 Herstellung von Hyaluronan-Oligosacchariden	35
4.2.3.10 Fluoreszenzmarkierung von Hyaluronan-Oligosacchariden	36
4.2.3.11 Inhibition des Hyaluronan-Exports durch Hyaluronan-Oligosaccharide.....	36
4.2.3.12 Fluoresceindiacetat-Efflux-Test	37
4.2.3.13 Hyaluronan-Export-Inhibitor Assay.....	37
4.2.3.14 Zytotoxizitätsmessung.....	38
4.2.3.15 Pulse-Chase-Experimente mit B6 Zellen	38
5 Ergebnisse.....	39
5.1 Einfluss von Hyaluronan-Oligosacchariden auf MRP5	39
5.2 Einfluss von Hyaluronan-Oligosacchariden auf den endogenen Hyaluronan -Export.....	41
5.3 Knock-down von MRP5 durch siRNA	42
5.4 Analyse der mRNA-Expression anderer ABC-Transporter in MRP5-defizienten FVB-Fibroblasten.....	45
5.5 Real-Time PCR zur Bestimmung der CFTR- und MRP4-mRNA-Expression in MRP5-defizienten FVB-Fibroblasten	46
5.6 Knock-down von CFTR durch siRNA.....	47
5.7 Inhibierung des Hyaluronan-Exports	50
5.7.1. Allgemeine Inhibitoren	50
5.7.2 Phosphodiesterase-Hemmer	52

5.7.3 Manipulation des NO- und cGMP-Spiegels.....	54
5.7.4 Manipulation des cAMP-Spiegels.....	59
5.7.5 Inhibition von Chlorid-Kanälen	61
5.7.6 Pflanzliche Polyphenole.....	63
5.8 Modulation des Hyaluronan-Exportes bei Calu-3-Zellen	65
5.9 Einfluss von Verapamil und Zaprinast auf den intrazellulären Hyaluronan-Spiegel.....	66
5.10 Einfluss der Inhibitoren auf die Hyaluronan-Synthase	67
5.11 Pulse-Chase	69
6. Diskussion	70
6.1 Einfluss von Hyaluronan-Oligosacchariden auf MRP5 und den endogenen Hyaluronan-Export.....	70
6.2 Identifizierung von MRP5 als Hyaluronan-Exporter mittels siRNA	71
6.3 Identifizierung des Hyaluronan-Exporters in MRP5-defizienten Zellen	71
6.4 Inhibition des Hyaluronan-Exportes	73
6.4.1 Allgemeine Inhibitoren	73
6.4.2 Phosphodiesterase-Hemmer	74
6.4.3 Manipulation des cGMP-Spiegels.....	75
6.4.4 Manipulation des intrazellulären cAMP-Spiegels.....	77
6.4.5 Einfluss von CFTR-Inhibitoren auf den Hyaluronan-Export.....	78
6.4.6 Pflanzliche Polyphenole.....	79
6.4.7 Einfluss von Verapamil und Zaprinast auf den intrazellulären Hyaluronan- Spiegel.....	80
6.5 Modell der Regulation des Hyaluronan-Exportes bei Wildtyp Fibroblasten.....	80
6.6 Modell zur Beteiligung von Hyaluronan am Krankheitsbild der Zystischen Fibrose.....	81
6.7 Ausblick	83
7. Literatur	84
8. Abkürzungsverzeichnis	93
Danksagung.....	95
Lebenslauf.....	96
Erklärung.....	97

1 Zusammenfassung

Hyaluronan bildet einen wichtigen Bestandteil der Extrazellulärmatrix. Nachdem der Ort der Synthese lange Zeit unbekannt war, konnte die Synthese 1984 an der zytosolischen Seite der Plasmamembran lokalisiert werden. Aber bislang konnte kein Hyaluronan-Exporter zweifelsfrei identifiziert werden. Die Synthese selbst galt lange Zeit als ein Kandidat. Auch über die Regulation des Exports war bisher nichts bekannt.

Diese Arbeit konnte erstmals den ABC-Transporter MRP5 (ABCC5) als Hyaluronan-Exporter in Fibroblasten durch die Hemmung mit siRNA zweifelsfrei identifizieren. Eine gezielte Reduktion der MRP5 mRNA- und Protein-Expression führte zu einer Abnahme des Hyaluronan-Exports. Auch ins Zytosol eingeschleuste Hyaluronan-Oligosaccharide können mit dem MRP5-Transporter wechselwirken und den Export des MRP5-Substrats Fluorescein und endogen synthetisierten Hyaluronans hemmen.

In Fibroblasten wird der Hyaluronan-Export durch den *second messenger* cGMP reguliert.

In MRP5-defizienten Fibroblasten wird MRP5 durch CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, ABCC7) ersetzt.

Eine spezifische Hemmung der CFTR-Expression durch siRNA verursachte eine Abnahme des Hyaluronan-Exportes aus diesen Zellen. Dies wirft ein völlig neues Licht auf die Pathologie der zystischen Fibrose, der häufigsten Erbkrankheit beim Menschen.

Eine Hemmung durch GlyH 101, der als spezifischer Inhibitor für den Chloridexport aus CFTR entwickelt wurde, reduzierte auch den Hyaluronan-Export.

Ein Defekt im Hyaluronan-Export des CFTR-Kanals bei Patienten mit Zystischer Fibrose kann viele unverständene Symptome der Zystischen Fibrose, insbesondere das Auftreten des zähen Mukus, erklären.

2 Einleitung

2.1 Aufbau und Synthese von Hyaluronan

Hyaluronan, ein hochmolekulares Polysaccharid, ist ein Bestandteil der Extrazellulärmatrix (ECM), der in vielen Geweben vorkommt. Obwohl Hyaluronan eine relativ einfache Struktur aufweist, ist es ein ungewöhnliches Molekül. Es ist ein großes lineares Glykosaminoglykan, das aus alternierenden Einheiten von Glucuronsäure (GlcA) und N-Acetylglukosamin (GlcNAc) besteht. Die einzelnen Zucker sind dabei β -glykosidisch ($\text{GlcA}\beta(1\rightarrow3)\text{GlcNAc}\beta(1\rightarrow4)$) verknüpft (Abb.1).

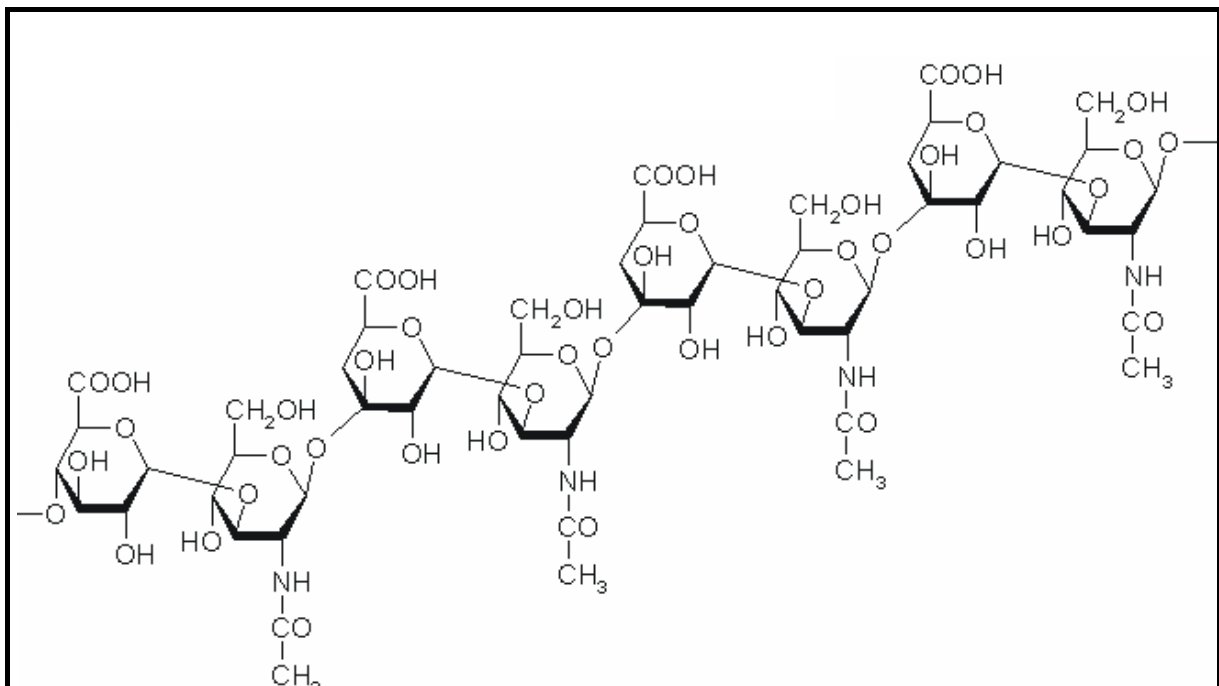


Abb.1: Strukturausschnitt von Hyaluronan

Hyaluronan wurde erstmals von Karl Meyer aus den Glaskörpern von Rinderaugen isoliert (Meyer & Palmer, 1934). Daher resultiert auch sein Name (hyalos, griech.: Glas). Im Folgenden wurde es aus vielen verschiedenen Geweben isoliert, z.B. aus Nabelschnur, Haut, Hahnenkämme (Meyer, 1947), aber auch aus Streptokokken (Kendall *et al.*, 1937). Es ist damit das einzige Glykosaminoglykan, das sowohl bei Prokaryonten als auch bei Eukaryonten vorkommt. Es weist ein Molekulargewicht von mehreren Millionen Dalton auf und ist aufgrund der Glucuronsäure unter physiologischen Bedingungen polyanionisch geladen.

Deshalb ist es stark hydratisiert, und dies führt zu einer enormen Volumenvergrößerung, ein Gramm Hyaluronan ist in der Lage sechs Liter Wasser zu binden. Ein Hyaluronanmolekül nimmt in wässriger Lösung die Struktur eines expandierten Zufallsknäuels mit einem Durchmesser von etwa 500 nm ein, das ein gewisses Maß an Steifheit aufweist (Laurent & Fraser, 1992). Aufgrund dieser Struktur und der Fähigkeit, Wasser und Salze zu speichern, kommt ihm eine wichtige Rolle bei der Regulation des Wasserhaushalts und des osmotischen Drucks zu (Comper & Laurent, 1978). Aber auch in der Synovialflüssigkeit erfüllt es in Folge seiner Thixotropie wichtige Aufgaben als Stoßdämpfer und Schmiermittel (Sundblad, 1950). In unbewegten Zustand verleiht es der Synovialflüssigkeit eine gewisse Festigkeit, bei Bewegung des Gelenkes wird seine Viskosität erniedrigt und seine „schmierenden“ Eigenschaften kommen zum Einsatz.

Als einziges der in der Extrazellulärmatrix vorkommenden Glykosaminoglykane (Chondroitinsulfat, Dermatan-sulfat, Heparansulfat und Keratansulfat) besitzt es keine Sulfatgruppe (Fraser, 1997). Es wird im Gegensatz zu den anderen Glykosaminoglykanen an der inneren Seite der Plasmamembran synthetisiert und nicht im endoplasmatischen Retikulum oder Golgi-Apparat (Prehm, 1984). Auch ist es nicht kovalent an ein Core-Protein gebunden. Bei der Synthese von Hyaluronan werden die beiden Vorstufen-Zucker UDP-GlcA und UDP-GlcNAc alternierend an das reduzierende Ende des wachsenden Hyaluronanmoleküls angehängt. Dabei wird der UDP-Rest des Hyaluronans gegen das entsprechende Monomer ersetzt (Prehm, 1983 a,b). Die Annahme, dass der Aufbau des Hyaluronanmoleküls in eukaryontischen Zellen vom nicht-reduzierenden Ende her geschieht (Bodevin-Authelet *et al.*, 2005), konnte widerlegt werden (Prehm, 2006). Somit ist Hyaluronan das einzige Glykosaminoglykan, das vom reduzierenden Ende her synthetisiert wird.

Es gibt drei Isoformen der Hyaluronan-Synthase (HAS), HAS-1, HAS-2 und HAS-3. HAS-1 und HAS-2 produzieren hochmolekulares Hyaluronan, HAS-3 hingegen produziert niedermolekulares Hyaluronan bis 200 kDa (Camenisch & McDonald, 2000). Die genaue Aufgabe von HAS-1 und HAS-3 sind noch nicht identifiziert (Tammi *et al.*, 2001). HAS-2 hingegen ist die Haupt-Hyaluronan-Synthase. Der Verlust von HAS-2 ist lethal, HAS-2-(-/-)-Mäuse sterben an Tag 9.5 *in utero* (Camenisch *et al.*, 2000).

Entgegen der bisherigen Annahme, dass die Hyaluronan-Synthase selbst als Exporter für das wachsende Hyaluronanmolekül in Streptokokken dient (Tlapak-Simmons *et al.*, 1998), konnte durch Arbeiten der Arbeitsgruppe Prehm gezeigt werden, dass die Synthase und der Export des Hyaluronans über die Protoplastenmembran hinweg durch zwei unterschiedliche Proteine

bewerkstelligt werden (Ouskova *et al.*, 2004). Es konnten Insertionsmutanten gebildet werden, die über eine intakte Synthese verfügten, aber keine Hyaluronanhülle mehr bilden konnten. Nach der Rekonstitution des fehlenden Genabschnitts waren diese Mutanten wieder in der Lage, eine Hyaluronanhülle auszubilden (Abb.2). Nach genauer Analyse stellte sich heraus, dass die bei der Transportermutante deletierten Genabschnitte für ein Transporter der *ATP-binding-cassette*-(ABC)-Familie codierten. Diese Transporter-Familie ist in Prokaryonten und Eukaryonten weit verbreitet und weist als gemeinsames Merkmal das Vorhandensein einer ATP-bindenden-Domäne auf. Der aktive Transport gegen einen Konzentrationsgradienten wird hierbei durch die Hydrolyse von ATP möglich.

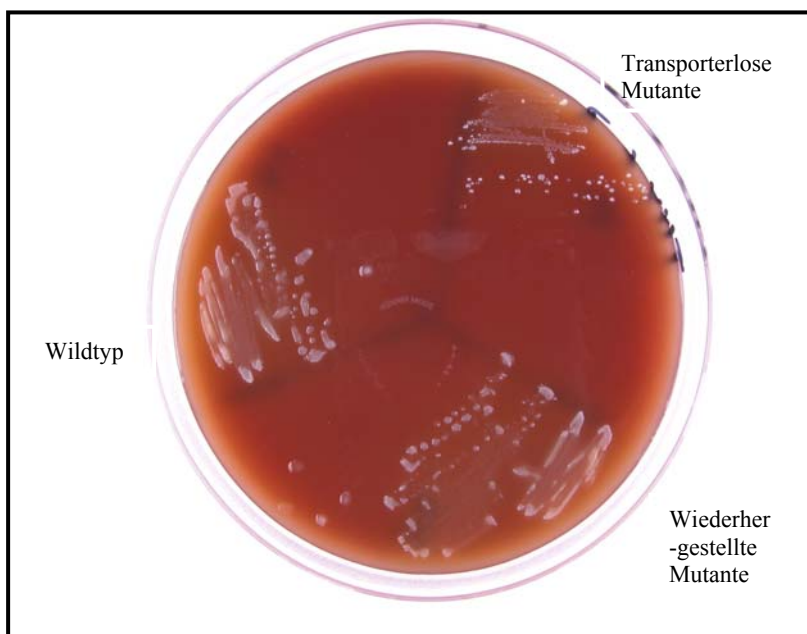


Abb. 2: Hyaluronanproduktion der Wildtyp Streptokokken und der Transportermutanten

(nach Ouskova *et al.*, 2004)

Zur weiteren Analyse wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt (Abb.3) und so mögliche Kandidaten für eukaryontische Hyaluronan-Exporter identifiziert.

Es stellte sich heraus, dass vor allem Mitglieder der Familie der *Multidrug Resistance Proteine* (MDR) und *Multidrug Resistance Related Proteine* (MRP) als Transporter in Frage kommen.

Diese wurden im weiteren durch Inhibitorstudien untersucht und MRP5 wurde als bester Kandidat für den Hyaluronan-Exporter in humanen Fibroblasten identifiziert (Prehm & Schumacher, 2005).

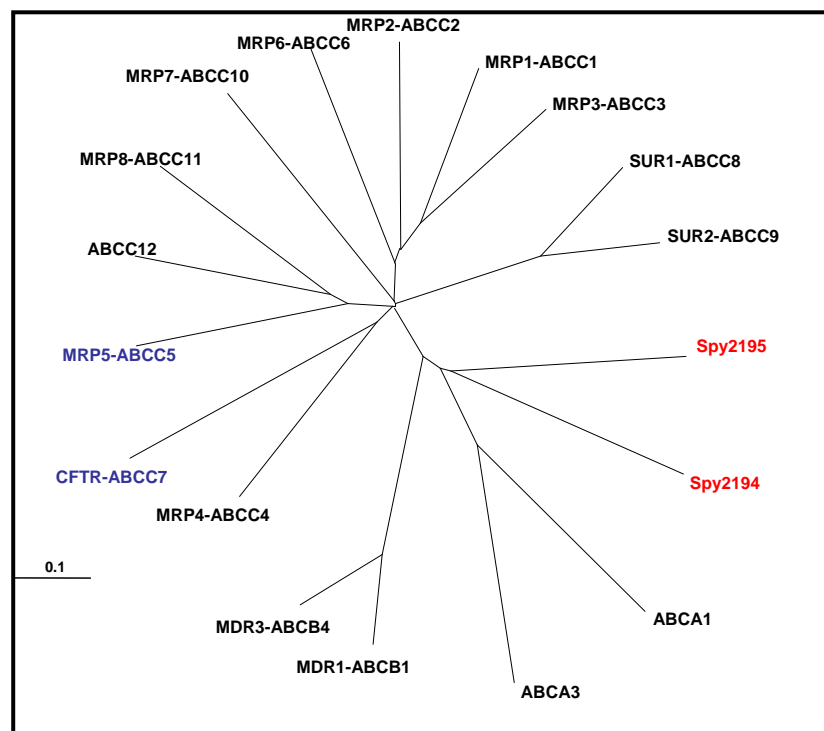


Abb.3: Phylogenetischer Stammbaum. **Rot:** Hyaluronan-Exporter in Streptokokken; **Blau:** im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Hyaluronan-Exporter in humanen Fibroblasten

2.2 Biologische Funktion von Hyaluronan

Hyaluronan spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, -entwicklung und -bewegung (Goa & Benfield, 1994). Es erleichtert die Zellproliferation und Migration bei der Embryonalentwicklung (Toole, 1997) und die Wundheilung (Longaker *et al.*, 1990). Hyaluronan ist darüber hinaus essentiell für die Mitose von Fibroblasten (Brecht *et al.*, 1986). Es ist ein Bestandteil des Bindegewebes, vor allem des Gelenkknorpels und der Dermis der Haut. Die Gesamtmenge in der Haut eines erwachsenen Menschen beträgt durchschnittlich 15 Gramm (Juhlin, 1997). Das Hyaluronan der Extrazellulärmatrix bindet durch spezielle Oberflächenrezeptoren, sogenannte Hyaladherine wie CD 44, HABP-1 (*hyaluronic acid binding protein-1*) oder RHAMM (*receptor for hyaluronan-mediated motility*, CD 168), an die Plasmamembran. Verschiedene Isoformen von RHAMM kommen aber auch im Zytoplasma und dem Nukleus vor. HABP-1 kommt sowohl im Zytoplasma wie auch auf der Zelloberfläche vor (Day & Prestwich, 2002). Ihre genaue Aufgabe im Zytoplasma liegt, wie auch die von HABP-1, noch im Dunkeln. Der ubiquitär vorkommende Hyaluronan-Rezeptor CD 44 ist an der Organisation und dem Umsatz der Extrazellulärmatrix

beteiligt. Außerdem vermittelt er die Migration von Leukozyten während entzündlicher Prozesse (Goodison *et al.*, 1999). Er kommt in vielen unterschiedlichen Isoformen vor, die durch die Splicevarianten von 10 verschiedenen Exons entstehen. Die Hyaluronan-bindenden Eigenschaften von CD 44 werden durch die Isoform und den Zelltyp, der sie expremiert, bestimmt (Lesley *et al.*, 1997). Die interzellulären Domänen von CD 44 interagieren, abhängig von ihrer Isoform, mit zytoskelettalen Proteinen und sorgen so für eine Verbindung von Hyaluronan und dem Zytoskelett (Bourguignon *et al.*, 1998).

Aber auch in die Tumorprogression und Metastasierung ist Hyaluronan involviert (Toole, 2004). Verschiedene Tumorarten, wie Brustkrebs (Auvinen *et al.*, 2000), Speiseröhrenkrebs (Setälä *et al.*, 1999), Darmkrebs (Ropponen *et al.*, 1998) oder auch Gliome (Delpech *et al.*, 1993), weisen eine erhöhte Hyaluronankonzentration im Vergleich zum gesunden Gewebe auf. Eine erhöhte Hyaluronanproduktion geht mit einer verminderten Prognose für den Patienten einher. Zum Beispiel erhöht sich die Rezidiv-Quote bei Darmkrebs von 20% auf 80%, wenn die Krebszellen eine erhöhte Hyaluronanproduktion aufweisen (Ropponen *et al.*, 1998). Auch gilt die Hyaluronankonzentration im Urin als ein bewährter Marker für Anwesenheit und Ausprägung von Blasenkrebs (Lokeshwar *et al.*, 2000). Eine erhöhte Hyaluronanproduktion führt auch zu einer Verstärkung des Tumorwachstums (Zoltan-Jones *et al.*, 2003) und der Invasivität der Tumorzellen (Itano *et al.*, 1999). Untersuchungen an Brust- und Hautkrebszellen haben gezeigt, dass diese Effekte durch den Einsatz von löslichem CD 44 wieder rückgängig gemacht werden können (Yu & Stamenkovic, 1999). Dies ist aber nur möglich, wenn das lösliche CD 44 in der Lage ist, Hyaluronan zu binden (Peterson *et al.*, 2000).

Hyaluronan ist einem starken Katabolismus unterworfen. Etwa ein Drittel des Hyaluronans im menschlichen Körper wird jeden Tag erneuert. Dies geschieht zum einen mittels CD 44-vermittelte Endozytose durch die Zellen der Extrazellulärmatrix, zum anderen aber auch in der Leber (Fraser *et al.*, 1997). Dabei unterscheidet sich die Halbwertszeit des Hyaluronans stark, je nach Gewebe, in dem es produziert wird. In der Haut beträgt sie 24 Std. (Tammi *et al.*, 1991), im Knorpel etwa 20 Tage (Morales & Hascell, 1988) und im Glaskörper des Auges etwa 70 Tage (Fraser *et al.*, 1997). Hierbei führt die Anwesenheit von reaktiven Sauerstoffspezies zur Fragmentation von Hyaluronan und verringert so die Halbwertszeit (Agren *et al.*, 1997). Im Lymphsystem wird Hyaluronan durch Rezeptor-vermittelte Endozytose von LYME-1 (*lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor*) abgebaut (Prevo *et al.*, 2001). Die Degradierung des endozytierten Hyaluronans findet dann in den Lysosomen durch Hyaluronidasen statt (Roden *et al.*, 1989).

Aber auch viele humanpathogene Bakterien der Familie *Streptococcus* oder *Pasteurella* produzieren Hyaluronankapseln, um eine Immunantwort des Körpers zu verhindern. Da es sich bei Hyaluronan um einen körpereigenen Stoff handelt, erkennt das Immunsystem die Bakterien nicht als fremd und kann sie so nicht bekämpfen. Auch das Komplementsystem wird nicht aktiviert. Die hohe negative Ladungsdichte verhindert darüber hinaus eine Phagozytose durch Zellen des Immunsystems (Whitnack *et al.*, 1981).

2.3 ABC-Transporter

Der spezifische Transport von Molekülen durch die Zellmembran ist eine essentielle Notwendigkeit für alle lebenden Organismen. Es haben sich im Laufe der Evolution eine große Zahl spezifischer Transporter entwickelt. Die größte Familie ist die ABC-(ATP *binding cassette*)-Transporter Superfamilie. Diese Proteine transportieren ein breites Spektrum an Substraten, wie Zucker, Aminosäuren, Metallionen, Peptide, Proteine, aber auch eine große Anzahl hydrophober Moleküle und Metaboliten durch die Zellmembran. ABC Gene sind essentiell für viele Prozesse in der Zelle und Mutationen führen zu verschiedenen Erbkrankheiten, wie z.B. *Pseudoxanthoma elasticum* (ABCC6/MRP6) oder auch Zystischer Fibrose (ABCC7/CFTR). Bisher sind 48 humane ABC-Transporter charakterisiert worden. Sie werden in sieben Subfamilien (ABC-A bis ABC-G) eingeteilt (Dean *et al.*, 2001).

Tab.1: ABC-Transporter-Familien

48 humane ATP-binding-casette-Transporter							
Name	ABC1	MDR	MRP	ALD	OABP	GCN20	White
Subfamilie	ABCA	ABCB	ABCC	ABCD	ABCE	ABCF	ABCG
Mitglieder	12	11	13	4	1	3	5

Darüber hinaus kommen sie aber auch in vielen anderen Organismen vor. Bei *Drosophila melanogaster* sind 56 bekannt, ebenso viele bei *Caenorhabditis elegans* und sogar bei 129 bei *Arabidopsis thaliana*.

Die ABC-Transporter besitzen meist zwei hochkonservierte zytoplasmatische ATP-bindende Domänen (*nucleotide binding folds* (NBF)) und zwei integrale Membrandomänen, die normalerweise aus sechs α -helikalen Transmembrandomänen (*membrane spanning domaine*, MSD) bestehen. Es kommen aber auch Varianten mit nur je einer ATP-bindenden- und einer

Membrandomäne vor. Diese bilden dann Homo- oder Heterodimere, um einen funktionellen Kanal bilden zu können (Hyde *et al.*, 1990).

Klinische Relevanz erlangten die ABC-Transporter, als bekannt wurde, dass MDR1 (ABCB1), ein Mitglied der Subfamilie der *multi drug resistance*-(MDR)-Transporter von Tumorzellen überexprimiert wird, nachdem diese mit Zytostatika behandelt wurden. Dies führte zu dem bekannten Phänomen der Zytostatikaresistenz bei Tumorzellen. Die Hochregulation des MDR1-Gens führt zu einer erhöhten Ausschleusung der Medikamente und damit zu einer Verringerung ihrer zytosolischen Konzentration und der Wirksamkeit. MDR-1 ist in der Lage, ein weites Spektrum hydrophober Substanzen aus der Zelle zu transportieren. Dazu gehören z.B. Colchicin, Doxorubicin, Adriamycin, Vinblastin, Digoxin, Sanquinivir und Paclitaxel (Dean *et al.*, 2001).

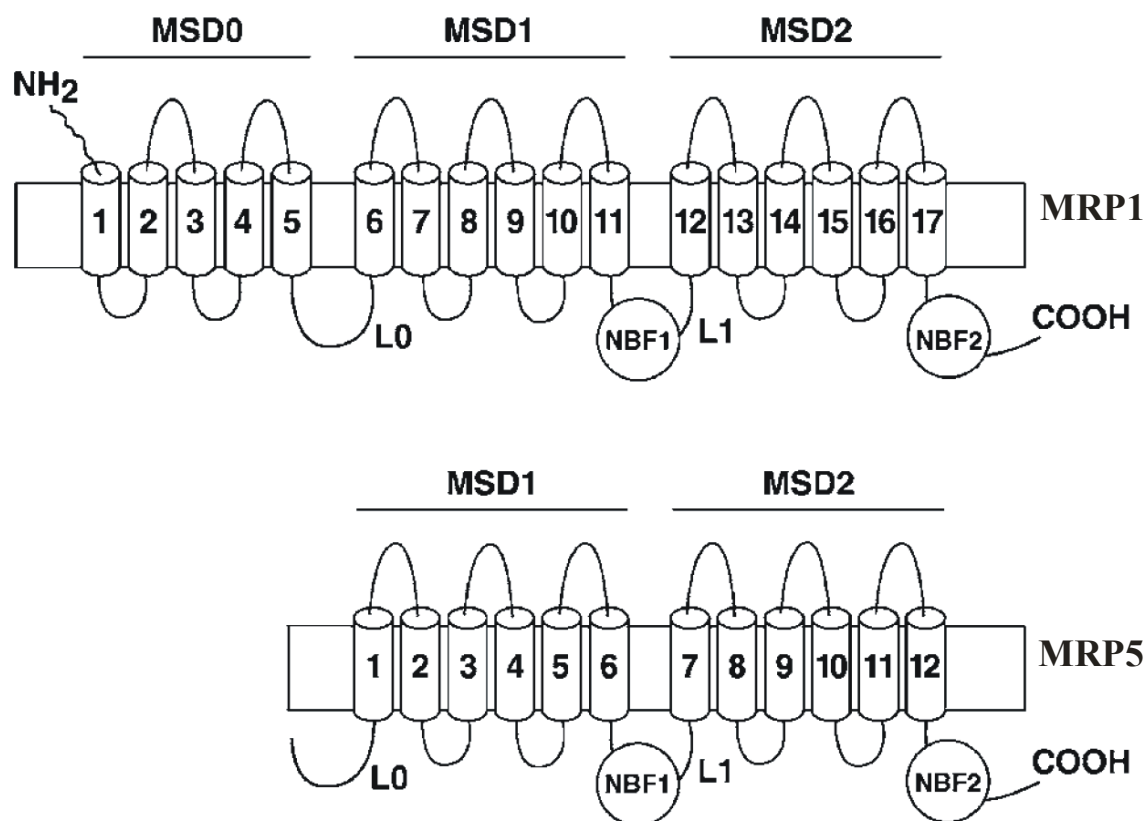


Abb.4: Topologisches Modell der Proteindomänen der Mitglieder der MRP-Familie

MRP1 repräsentiert die Mitglieder MRP2, MRP3, MRP6 und MRP7. MRP5 steht für die Mitglieder MRP4, CFTR, MRP8 und MRP9. MSD: integrale Membrandomäne (*membrane spanning domaine*), NBF: Nukleotid-bindende Domäne (*nucleotide binding fold*) (aus Kruh & Belinsky, 2003).

Die Mitglieder der MRP- (*multi drug resistance related protein*)-Familie werden, anders als die der MDR-Familie, schwach in allen Säugerzellen expremiert. Auch sie haben ein breites Substratschema. Sie exportieren organische Anionen, an Gluthation, Sulfat oder Glukuronat gekoppelte Substanzen, aber auch Gallensalze und zyklische Nukleotide (Kruh & Belinsky, 2003). Die MRP-Transporter MRP4, MRP5, CFTR, MRP8 und MRP9 verfügen im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern der Familien nicht über die dritte integrale Membrandomäne MSD0. MSD0 besteht, anders als MSD1 und MSD2, nur aus fünf α -helikalen Transmembrandomänen (Belinsky *et al.*, 1998).

Vor allem MRP4 und MRP5 sind in der Lage, zyklische Nukleotide, wie cAMP und cGMP, aus der Zelle zu transportieren. Dabei weisen sie eine unterschiedlich hohe Affinität zu den Substraten auf. MRP5 hat eine hohe Affinität zu cGMP (K_M : 2 μ M) und eine niedrige zu cAMP (K_M : 400 μ M) (Jedlitschky *et al.*, 2000). Bei MRP4 ist es genau anders herum. Es hat eine niedrige Affinität zu cGMP (K_M : 180 μ M) (Sager *et al.*, 1996) und eine höhere zu cAMP (K_M : 45 μ M) (Chen *et al.*, 2001). MRP5 ist auch als „Überflussventil“ von cGMP in der Zelle identifiziert worden, seine Affinität zu cGMP ist äquivalent zu der intrazellulären Konzentration dieses zyklischen Nukleotids (Andric *et al.*, 2006). Aufgrund der Bedeutung der MDR- und MRP-Transporter in der Krebstherapie sind gegen sie viele spezifische Inhibitoren auf dem Markt. Dazu gehören unter anderem Verapamil (MDR1), Probenicid (MRP1) oder Zaprinast (MRP5) (Schinkel & Jonker, 2003).

2.4 Zystische Fibrose und CFTR

Zystische Fibrose ist die häufigste autosomal rezessive Erbkrankheit bei Europäern. Die Inzidenz liegt bei 1:25 für heterozygote Träger und 1:2500 für homozygote (Brennen & Geddes, 2002). Sie wird durch die Abwesenheit oder Nichtfunktionalität des CFTR-Kanals (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, ABCC7) hervorgerufen. Der CFTR-Kanal wurde als Chlorid-Kanal identifiziert und wird in der apikalen Membran von Epithelzellen der Atemwege, des Pankreas, der Schweißdrüsen, des Darms oder der Gallengänge expremiert (Collins, 1992). CFTR wird durch cAMP aktiviert und neben seiner Funktion als Chloridkanal kann CFTR auch noch andere Ionenkanäle kontrollieren. Dazu gehören unter anderem der epitheliale Natriumkanal (ENaC), spannungsabhängige Kaliumkanäle und ein Aquaporin (AQP3). Auch Endo- und Exozytose kann durch CFTR reguliert werden (Greger *et al.*, 2001).

Tab.2: Klassifikation der CFTR-Genotyp Mutationen (nach Turcius, 2005)

Mutations-Klasse	CFTR-Defekt
I	kein Nachweis von CFTR-mRNA möglich, keine Proteinexpression
II	abnormales Protein wird gebildet, kann das endoplasmatische Retikulum aber kaum verlassen, geringe Plasmamembrankonzentration (z.B. bei $\Delta F508$)
III	Defekt in der Regulation und Aktivierung von CFTR in der Plasmamembran
IV	Defekt bei der Aufrechterhaltung des Membranpotentials
V	Teilweise defekte Translation oder Prozessierung
VI	Defekt in der Regulation anderer Kanäle durch CFTR

Die unterschiedlichen Mutationen lassen sich in sechs Klassen einteilen (Tab. 2). Die Klassen I-III sind die häufigsten und gehen mit Pankreasschäden einher, die Klassen IV-VI sind eher selten und zeigen normalerweise keine Pankreasschäden.

Die häufigste Mutation ist der Verlust eines Phenylalaninrestes an Position 508 ($\Delta F508$) des 1480 Aminosäuren großen Proteins. Daraus resultiert ein zwar funktionsfähiges Protein, dies verlässt jedoch selten das endoplasmatische Retikulum und hat auch eine viermal geringere Halbwertszeit als unmutiertes (Bertrand & Frizzell, 2003). Durch den Einsatz von Chaperon-Inhibitoren lässt sich der Transport des $\Delta F508$ -CFTRs zum Proteasom allerdings verhindern und der Transport in die apikale Membran stimulieren. Dies führt zu einer fast völligen Wiederherstellung der natürlichen Membranpotentialdifferenz (Egan *et al.*, 2004). Zu den typischen Symptomen der Zystischen Fibrose gehören Darmverschluss, Peritonitis, Pankreatitis, Leberzirrhose und als bekanntestes: Lungenerkrankungen durch zu zähen Schleim. Es kommt hierdurch auch sehr oft zu chronischen Lungeninfektionen durch *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* (Guilbault *et al.*, 2006). Der Mukus ist zu fest und kann so nicht von den Zilien abtransportiert werden. Er bietet so ideale Bedingungen für die Besiedlung durch Bakterien. Auch können die Bakterien, vor allem *Pseudomonas aeruginosa*, direkt an das mutierte CFTR binden und so besser auf dem Lungenepithel siedeln (Brennen & Geddes, 2002). Des Weiteren wird eine reduzierte Aktivierung von β -Defensin, einem antimikrobiellen Peptid, durch erhöhte Salzkonzentration im *airway surface liquid* (ASL) diskutiert. ASL von gesunden Probanden ist, im Gegensatz zu dem von CFTR-Patienten, in der Lage, *P. aeruginosa* abzutöten (Smith *et al.*, 1996).

Die ursprüngliche Lehrmeinung, bei der ein verminderter Chloridexport durch das Fehlen oder die Unterfunktion von CFTR für die Verfestigung des Mukus verantwortlich ist, wird mittlerweile kontrovers diskutiert. Das exportierte Chlorid soll dann Wasser aus dem Lungenepithel nach sich ziehen und somit die Viskosität des Mukus herabsetzen. Es hat sich aber gezeigt, dass das ASL von gesunden und Zystische Fibrose-Patienten gleiche Salzkonzentrationen enthält. Die Schwierigkeit liegt hier besonders in der Bestimmung dieser Konzentration (Boucher, 2007). Neben der Inaktivierung der antimikrobiellen Peptide wie Defensin im Mukus wird aber auch eine von Geburt an proinflammatorische Lunge diskutiert (Khan *et al.*, 1995). Aber alles in allem sind die einzelnen Erklärungsansätze sehr unbefriedigend und können auch immer nur einen Teil der klinischen Symptome erklären. Eine befriedigende Erklärung für das Auftreten der verschiedenen Symptome fehlt bisher. Aufgrund seiner prominenten Rolle bei der Pathologie der Zystischen Fibrose ist CFTR das am meisten untersuchte Membrantransportprotein (Dawson *et al.*, 1999). Es ist eine große Anzahl von Aktivatoren und Inhibitoren auf dem Markt erhältlich.

2.5 Stickstoffmonoxid und die cGMP-Signalkaskade

Da viele der im Rahmen dieser Dissertation eingesetzten Inhibitoren in die Stickstoffmonoxid-(NO)- oder cGMP-Signalkaskade eingreifen, soll an dieser Stelle kurz darauf eingegangen werden. Es ist bekannt, dass die zyklischen Nucleotide cAMP und cGMP eine Vielzahl verschiedener Prozesse in unterschiedlichen Geweben regulieren. Dabei war es lange unklar, wie diese einfachen Moleküle zum Einen spezifisch agieren können und zum Anderen aber eine funktionelle Diverität aufweisen. Es war lange unverstanden, warum sowohl sehr schnell ablaufende als auch sehr langsam ablaufende Prozesse durch den selben Mechanismus gesteuert werden konnten. Die Entdeckung verschiedener Isoformen der anabolen (Zyklasen) und katabolen Enzyme (Phosphodiesterasen) von cGMP und cAMP hat hier sehr geholfen (Beavo & Brunton, 2002).

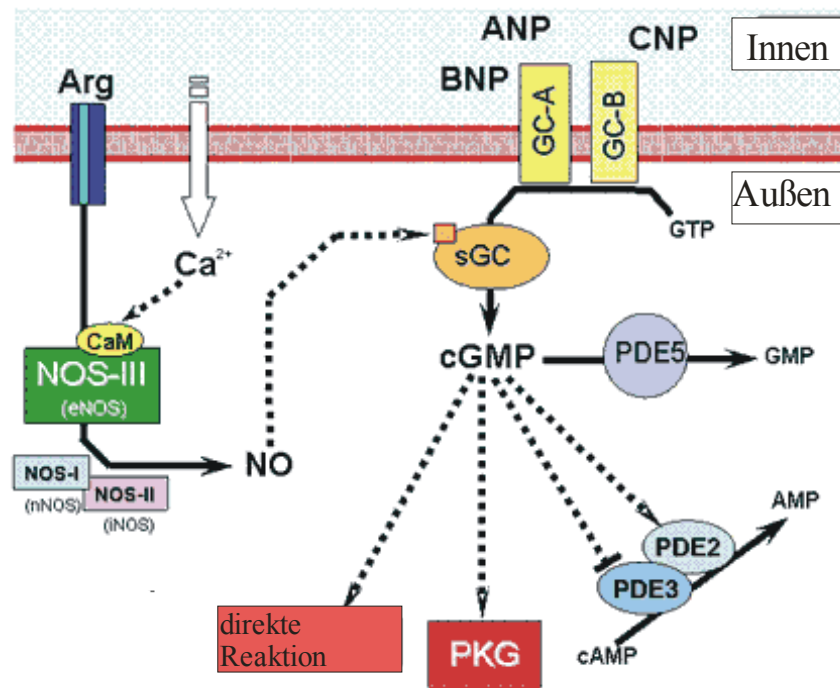


Abb.5: Schema des cGMP-Signalwegs

Durchgezogene Linien geben kovalente Modifikationen an, gestrichelte geben Interaktionen an. ANP: Atrielles Natriuretisches Peptid; Arg: L-Arginin; BNP: *Brain* Natriuretisches Peptid; CaM: Calmodulin; cGMP: zyklisches GMP; CNP: C-Typ Natriuretisches Peptid; GC-A, GC-B: membranständige Guanylatzyklase; NOS-I-III: Stickstoffmonoxidsynthase I-III; PDE2, PDE3, PDE5: Phosphodiesterase 2, 3, 5; PKG: Proteinkinase G; sGC: lösliche Guanylatzyklase. (Modifiziert nach Dr. Luis Agullo, Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spanien).

Das cGMP wird entweder durch die, mittels ANP (atrielles Natriuretisches Peptid), BNP (*brain* Natriuretisches Peptid) oder CNP (C-Typ Natriuretisches Peptid) aktivierbare membranständigen Guanylatzyklase oder durch die Stickstoffmonoxid (NO) abhängige lösliche Guanylatzyklase (sGC) bereitgestellt. Da Fibroblasten keine membranständige Guanylatzyklase exprimieren (Lucas *et al.*, 2000), wird im Folgenden nicht weiter auf sie eingegangen. Die sGC liegt in der Zelle in zwei verschiedenen Aktivitätsformen vor. Bei niedriger NO-Konzentration weist sie nur eine geringe Zyklaseaktivität auf, stellt aber eine basale cGMP-Konzentration sicher. Bei hoher NO-Konzentration kann sie innerhalb kürzester Zeit ihre Aktivität um mehr als das hundertfache erhöhen und große Mengen an cGMP produzieren (Stone & Marletta, 1994). Dies wird durch die Bindung des NOs an ein Eisen(II)-Atom im aktiven Zentrum der Zyklase und dadurch bedingte Konformationsänderungen hervorgerufen (Cary *et al.*, 2006). NO wird durch die zytosolische NO-Synthase aus Arginin in Gegenwart von Sauerstoff und NADPH unter Bildung von Citrullin bereitgestellt. Da NO auch durch die Plasmamembran diffundieren kann, kann es auch exogen bereitgestellt werden. Therapeutisch geschieht dies beim Einsatz von NO-freisetzenden Vasodilatoren. Der

steigende cGMP-Spiegel sorgt dafür, dass cGMP-abhängige Proteinkinasen aktiviert werden, dies führt zu einer verminderten zytosolischen Calciumkonzentration mit dem Ergebnis, dass die glatten Muskelzellen erschlaffen. Die Gefäße erweitern sich. Der Calcium-Efflux wird durch die Phosphorylierung und Aktivierung der membranständigen Calcium-ATPase erreicht. Aber auch die Inhibierung der Phosphodiesterasen (PDE) insbesondere der PDE5 hat denselben Effekt.

Hohe cGMP-Spiegel werden durch Phosphodiesterasen wieder gesenkt. Die PDEs bilden eine Superfamilie mit elf Mitgliedern, die in der Lage sind, cGMP und cAMP zu hydrolysieren. Die PDE 5, 6 und 9 sind cGMP-spezifisch, die PDE 1-3, 10 und 11 spalten sowohl cGMP als auch cAMP. Die PDE 4 schließlich ist cAMP-spezifisch.

PDE5-Inhibitoren haben zum einen vasodilative Effekte, aber zum anderen traten bei den behandelten männlichen Patienten als Nebenwirkungen verstärkte Erektionen auf. Da die PDE5 im Urogenitaltrakt stark expremiert wird, führt eine Hemmung zu erhöhten cGMP-Konzentrationen in den Ringmuskeln der Arterien des *Corpus carvernosum* und somit zu ihrer Erschlaffung. In der Folge werden die Gefäße weitgestellt und das Blut kann leichter in die Schwellkörper fließen (Rosen & Kostis, 2003). Diese Nebenwirkung wurde daraufhin zur Hauptwirkung erklärt und die Medikamente unter den Markennamen Lewitra[®], Cialis[®] und Viagra[®] vertrieben. Auch das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Zaprinast fällt in diese Substanzklasse. Die PDE5 Inhibitoren sind chemische Strukturanaloga von cGMP und weisen deshalb eine Wirkung auf den cGMP-transportierenden Kanal MRP5 auf. Allerdings sind hierfür höhere Konzentrationen als für die Hemmung der PDE5 nötig (Reid *et al.*, 2003; Giordarno *et al.*, 2001)

3 Zielsetzung

Hyaluronan ist ein entscheidender Bestandteil der Extrazellulärmatrix. Seit seiner Entdeckung 1934 durch Karl Meyer (Meyer & Palmer, 1934) hat es 50 Jahre gedauert (Prehm, 1984), bis die Hyaluronan-Synthase in der Plasmamembran lokalisiert werden konnte. Die Identifizierung des Hyaluronan-Exporters und der Regulierung des Exports hingegen war bisher nicht gelungen. Die bisherigen Modelle waren nicht überzeugend und konnten auch nicht zweifelsfrei bewiesen werden.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte erstmals der Hyaluronan-Exporter in Fibroblasten durch gezielte Reduktion der mRNA geeigneter Kandidatengene, wie MRP5 und CFTR, identifiziert werden und eine mögliche Regulation des Exports durch zytosolische Moleküle charakterisiert werden. Das bisherige Modell, in dem die Hyaluronan-Synthase auch als Exporter fungiert, sollte durch ein überzeugenderes, auch zu beweisendes Modell ersetzt werden.

Darüber hinaus sollten alternative Hyaluronan-Exporter identifiziert werden und die Beteiligung von Hyaluronan an der Pathobiochemie der Zystischen Fibrose beleuchtet werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zelllinien

B6	Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Münster
Calu-3	Hermann Schillers, Institut für Physiologie, Münster
humane Fibroblasten	Hautbiopsien, Münster
MRP5-überexprimierende HEK293	Piet Borst, Niederlande
FVB-Mausfibroblasten	Piet Borst, Niederlande
MRP5-defiziente FVB-Mausfibroblasten	Piet Borst, Niederlande

4.1.2 Reagenzien für die Zellkultur

Antibiotika-Lösung	Sigma, Taufkirchen
DMEM	Gibco, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FKS)	Gibco, Karlsruhe
nichtessentielle Aminosäuren	PAA, Kölbe
Quantum 333	PAA, Kölbe
RPMI 1640	Gibco, Karlsruhe
Trypsin-EDTA-Lösung (1x)	Sigma, Taufkirchen

4.1.3 Bakterienstämme und Nährmedien

<i>Escherichia coli</i> TOP10	Invitrogen, Groningen, NL
Ampicillin-Lösung	200 mg/ml Ampicillin in 70%igem Ethanol
LB-Medium	1% Bacto-Trypton; 0,5% NaCl; 0,5% Hefeextrakt in Aqua dest.
LB-Amp-Medium	LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin

LB-Amp-Agar	LB-Amp-Medium mit 1,5% Agar
SOC-Medium	2% Bacto-Trypton; 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl ₂ ; 10 mM MgSO ₄ ; 20 mM Glukose in Aqua dest.

4.1.4 Standardlösungen und Puffer

Blockpuffer	PBST mit 5% (w/v) Milchpulver
Blottingpuffer	Pierce, Rockford, USA
Laufpuffer Hyaluronan-Synthase	1M NH ₄ OAc in Ethanol, pH 5,5
PBS	Biochrom, Berlin
PBST	PBS mit 0,5% Tween 20
SDS-PAGE-Elektrodenpuffer	1 M Glycin, 124 mM Tris/HCl, 17 mM SDS
3xSDS-PAGE-Probenauftragspuffer	1,75 ml Sammelgelpuffer, 5 ml 10% SDS- Lösung (w/v), 1,5 ml Glycerin, 0,5% β- Mercaptoethanol, 1,5 ml Bromphenolblau (ges. Lösung in 0,1% Ethanol in H ₂ O)
SDS-PAGE-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, pH 6,8
SDS-PAGE-Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8
TAE-Puffer	20 mM NaOAc, 40 mM Tris/HCl, pH 8
TBS	50 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4
TBST	TBS mit 0,5% Tween 20
Verdauungspuffer Hyaluronan	150 mM NaCl, 100 mM NaOAc, pH 5,2

4.1.5 Antikörper

Kaninchen-anti-Maus-IgG-HRPO	Sigma, Taufkirchen
Maus-anti-CFTR-IgM	Acris Antibodies, Hiddenhausen
Ratte-anti-MRP5-IgG	Chemicon, Schwalbach
Ziege-anti-Ratte-IgG-HRPO	Chemicon, Schwalbach

4.1.6 Oligonukleotide und siRNA

siRNA	<i>sense</i>	<i>antisense</i>
MRP5 1	CCCAGGUUCCGGAGAACAAtt	UUGUUCUCCGGAACCUGGGtt
MRP5 2	AAUUCUGGACGAGGAGCAUtt	AUGCUCUCCGUCCAGAAUtg
MRP5 3	UCGUGUGCCUGAUGAUCACtt	GUGAUCAUCAGGCACACGAtg
CFTR 1	GCAGAGUGUUUAAGUUUAUtt	AUAAACUUAAACACUCUGCtc
CFTR 2	GCUGAAAAUGACCCGGAAGtt	CUUCCGGGUCAUUUUCAGCtc
CFTR 3	GGCGGCCUAUAUGAGGUUCtt	GAACCUCAUAUAGGCCGCCtt

Die siRNA wurde von Ambion, Cambridgeshire, UK bezogen.

Gen	Primersequenz (5'-3') <i>forward</i>	Primersequenz (5'-3') <i>revers</i>
β-Aktin	CGTGCGTGACATCAAAGAGA	TCCTGTCAGCAATGCCTGGG
MDR1	GCAATTTAGTGGAGTCGTGTTC	GCAAGACTTAGTGGTGCTAG
MRP1	CTGATGAAGAAGTCTGGATGG	GTGAGGGCTTGAAGAGGAAA
MRP 2	TTGGCTCATCTCAATCCTT	ACAATCTTGCCGCTCTCTAG
MRP 3	CTATGCCTTACAGGTGACCA	GGGACAACATCAGGTACTAAT
MRP 4	ATGTGGACCCAAGAACGGAT	GGCTGTCCATTGGAGGTGTT
MRP 5	CATAGCAAGAGCAAGAGCCC	GTGGTAATCAGGGCAATGCT
MRP 6	GGATGAACCTGGACCTGCTT	TGCCCCTCTCCATGACTAGG
CFTR	AGTGACCTTACAAGAATGGAG	GGCAATCCAACATCGCTTCTA
MRP 8	CGTTCACGCCTCTCCATC	AGTTGCTTCGTCCATGATGCT

Die Primer wurden von MWG Biotech, Ebersberg bezogen.

4.1.7 Inhibitoren und Aktivatoren

Benzbromaron	Sigma, Taufkirchen
Forskolin	Sigma, Taufkirchen
GlyH 101	Calbiochem, Darmstadt
IBMX	Sigma, Taufkirchen
Isoproterenol	Sigma, Taufkirchen
L-NAME	Sigma, Taufkirchen
NPPB	Sigma, Taufkirchen
Quercetin	Sigma, Taufkirchen
Rolipram	Sigma, Taufkirchen
Silibinin	Sigma, Taufkirchen
Thapsigargin	Sigma, Taufkirchen
Verapamil	Sigma, Taufkirchen
Zaprinast	Sigma, Taufkirchen

4.1.8 Reagenziensätze

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Hilden
Omniscript RT Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Groningen, NL

4.1.9 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Roth, Karlsruhe
Agar	Applichem, Darmstadt
Alamar Blue	Biosource, Camarillo, USA
8-Bromo-cGMP	Sigma, Taufkirchen
Cholera-Toxin	Sigma, Taufkirchen

Coomassie Brilliant Blue R-250	Biorad, München
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTPs, 100 mM)	Promega, Mannheim
DMSO	Roth, Karlsruhe
ECL-Lösung	Pierce, Rockford, USA
[³ H]-Glucosamin	NEN, Köln
Glycerin	Applichem, Darmstadt
Hefeextrakt	Applichem, Darmstadt
Histamin	Sigma, Taufkirchen
Interleukin 1 α	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
NaCl	Applichem, Darmstadt
Oligo dT-Primer	MWG Biotech, Ebersberg
Platinum SYBR Green qPCR	Invitrogen, Groningen, NL
SuperMix-UDG	
SeeBlue Plus 2 pre-stained Standard	Invitrogen, Groningen, NL
Szintillationsflüssigkeit	Lumac LSC, Groningen, NL
Taq-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt
Tris	Roth, Karlsruhe
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Triton X-100	Sigma, Taufkirchen
UDP-[¹⁴ C]-Glucuronsäure	NEN, Köln

Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von Sigma bezogen.

4.1.10 Geräte

ABI Prism 310 Genetic Analyser	Perkin Elmer, Foster City, USA
Analysenwaage, Typ AE163	Mettler, Gießen
Autoklav	H+P Labortechnik, Oberschleißheim
Brutschrank B6060	Heraeus, Düsseldorf
Coulter Counter Z1	Beckman Instruments, Klosterneuburg
Elektrophoresekammern	Eigenbau, Institutswerkstatt
Elektrophoresesystem XCell II Mini-Cell	Invitrogen, Groningen, NL

Gelair Sterilbank	Flowlaboratories, Meckenheim
HPLC	Waters, Eschborn
Mastercycler ep realplex	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop Axiovert 100	Zeiss, Jena
Minizentrifuge 5412	Eppendorf, Hamburg
Optima LE-80K Ultrazentrifuge	Beckman, Palo Alto, USA
Parr Bombe	Eigenbau, Institutswerkstatt
Spannungsquelle ECPS 300/150	Pharmacia, Freiburg
Synergy HT ELISA Reader	BIOTEK, Bad Friedrichshall
Szintillationszähler	Beckman Instruments, Klosterneuburg
Thermocycler	Eppendorf, Hamburg
UV-Illuminator	MWG-Biotech, München
XCell II-Blot Modul	Invitrogen, Groningen, NL
Zentrifuge Rotana P	Hettich, Tuttlingen

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Zellkulturbedingungen

Alle verwendeten Zelllinien wurden bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 7% CO₂ kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden an einer Sterilbank (Gelaire, Flowlaboratories, Meckenheim) durchgeführt. Zum Passagieren der adhärenenten Zellen wurden diese mit 37°C warmen PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin/EDTA (Sigma, Taufkirchen) abgelöst. Die Zellsuspension wurde in FKS-haltigem Kulturmedium (DMEM, RPMI) aufgenommen. Die Zellen werden mittels eines Coulter Counters gezählt. Das Sedimentieren erfolgte bei 150g für 10 min bei Raumtemperatur.

4.2.1.2 Einfrieren und Auftauen eukaryontischer Zellen

Zur Kryokonservierung eukaryontischer Zellen wurden diese in 4°C kaltem Einfriermedium (Kulturmedium, 10% DMSO) aufgenommen, bei -80°C eingefroren und anschließend bei -196°C in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen erfolgt möglichst rasch bei 37°C. Die aufgetauten Zellen wurden mit Kulturmedium gewaschen und in Kultur genommen.

4.2.1.3 Zelllinien

Calu-3

Hierbei handelt es sich um immortalisierte, humane seröse Drüsenzellen. Sie wurden aus einem Adenokarzinom der Lunge isoliert (Fogh *et al.*, 1977). Die Kultivierung erfolgt in Zellkulturflaschen in DMEM, 10% FKS (v/v), 10% nichtessentiellen Aminosäuren (PAA, Kölbe) und Penicillin/Streptomycin (je 100 U). Sie werden 1:3 passagiert.

Humane Fibroblasten

Die humanen Hautfibroblasten stammen aus Hautbiopsien.

Die Kultivierung erfolgt in Zellkulturflaschen. Das Medium besteht aus DMEM, 10% (v/v) FKS und Penicillin/Streptomycin (je 100 U). Sie werden 1:3 passagiert.

FVB Wildtyp/MRP5-defizient

Hierbei handelt es sich um murine Fibroblasten, die aus FVB/N- Mäusen isoliert wurden. Dieser Stamm wurde in den frühen 1970er Jahren als Inzuchtstamm für das Fv1b-Allel mit einer Sensitivität gegen das Friend'sche Leukämie Virus B etabliert. Diese Mäuse sind Albinos und tragen eine Mutation im *Pdeb^{rd1}*-Gen und leiden an einer Retinadegeneration. Der FVB MRP5-defiziente Stamm und der FVB Hintergrundstamm wurden von Piet Borst zur Verfügung gestellt (de Wolf *et al.*, 2007).

Die Zellen werden in Quantum 333 (PAA, Kölbe) mit Penicillin/Streptomycin (je 100U) kultiviert und 1:3 passagiert.

HEK293 MRP5

Bei den HEK293 Zellen handelt es sich um eine adenovirus-transfizierte humane embryonale Nierenzelllinie (Graham *et al.*, 1977).

Die MRP5 überexprimierenden HEK293-Zellen wurden von Piet Borst zur Verfügung gestellt (Wijnholds *et al.*, 2000). Das Medium besteht aus RPMI 1640 (Invitrogen), 10% FKS und Penicillin/Streptomycin (je 100 U). Sie werden 1:3 passagiert.

B6

Hierbei handelt es sich um eine semiadhärente Maus-Hamster-Hybridzelllinie (Koyama *et al.*, 1970). Sie ist gekennzeichnet durch eine hohe Hyaluronanproduktion (Prehm, 1983). Das Medium entspricht dem der humanen Fibroblasten. Sie werden 1:10 bis 1:20 passagiert.

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 Herstellung chemisch-kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

TFB I Puffer

50 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$

100 mM KCl

10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

30 mM KOAc

15 % (v/v) Glycerin

pH 6,1

TFB II Puffer

75 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$

10 mM KCl

10 mM MOPS

15 % (v/v) Glycerin

pH 7,0

Mit 500 μl einer Übernachtskultur der Zellen wurden 50 ml antibiotikafreies LB-Medium angeimpft. Es wurde bei 37°C unter Schütteln bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0,45-0,55$ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 15 min bei 2000g sedimentiert und auf Eis in 1/10 Volumen TFB I resuspendiert. Nach 20 min Inkubation wurde erneut sedimentiert und die Zellen in 1/25 Anfangsvolumen TFB II aufgenommen. Es wurden Aliquots a 50 μl hergestellt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

4.2.2.2 Transformation von *E. coli*

Zur Transformation wurden ausschließlich chemisch-kompetente Zellen verwandt. Die Transformation erfolgte nach einer Inkubation von 30 min auf Eis mittels eines Hitzeschocks (42°C, 45 sec). Anschließend wurden die Zellen 2 Std. bei 37°C in SOC-Medium inkubiert und anschließend ausplattiert.

4.2.2.3 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Plasmidisolierung erfolgte aus 5 ml Übernachtskulturen mit dem Qiaprep Spin Miniprep Kit mittels alkalische Lyse der Zellen durch NaOH und anschließender Sälenaffinitätschromatographie. Die Bakterien wurden sedimentiert (3000g/5 min) und das Pellet in 250 μl Puffer P1 resuspendiert. Anschließend wurde die Zellen durch die Zugabe von 250 μl Puffer

P2 lysiert. Nach fünfminütiger Inkubation wurde mit 350 µl Puffer N3 neutralisiert und das Lysat zentrifugiert (13000g/10 min). Der Überstand wurde auf eine QIAprep Spin Säule gegeben und für 30s bei 13000g zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säule wurde mit 500 µl Puffer PB und anschließend mit 750 µl Puffer PE gewaschen (13000g/30s). Die DNA wurde mit Aqua dest. eluiert (13000 /30s) und bei -20°C gelagert.

4.2.2.4 RNA-Isolierung

Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen. Das Zellenpellet wurde mit 500 µl Puffer RLT (inkl. 10% β-Mercaptoethanol) lysiert und auf eine QIAshredder-Säule gegeben und für 2 min bei 10000g homogenisiert. Der Durchlauf wurde mit 350 µl Ethanol (70%) vermischt, komplett auf eine RNeasy-Säule gegeben und zentrifugiert (10000g/1 min). Anschließend wurde die Säule einmal mit 700 µl Puffer RW1 und zweimal mit Puffer RPE gewaschen (10000g/1 min). Die restliche Flüssigkeit wurde entfernt (10000g/1 min) und die RNA mit 30µl RNase-freiem Wasser eluiert (10000g/1 min). Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Lösung erfolgte photometrisch bei 260 nm und die erhaltene RNA-Lösung wurde bei -80°C gelagert.

4.2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Konzentrationsbestimmung einer Nukleinsäurelösung wurde über die Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm durchgeführt. Die Konzentration berechnet sich wie folgt:

$$c = [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260} \times V \times F$$

F = 50 für doppelsträngige DNA

= 40 für RNA

4.2.2.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Bei der Polymerasekettenreaktion handelt es sich um eine der wichtigsten Methoden der Molekularbiologie (Saiki *et al.*, 1988). Hierbei werden definierte DNA-Abschnitte gezielt *in vitro* amplifiziert.

Prinzipiell besteht eine PCR-Reaktion aus drei Teilschritten. Im ersten Schritt wird der doppelsträngige DNA-Strang durch Erhitzen auf 95°C aufgeschmolzen. Im folgenden Hybridisierungsschritt lagern sich die spezifischen Primer an die DNA an und im dritten Schritt erfolgt schließlich die Synthese des neuen DNA-Strangs durch eine thermostabile DNA-Polymerase.

Für die PCR wurden nach folgendem Standard-Ansatz und Programm durchgeführt

:

2,5 µl DNA (aus der RT-PCR)	95°C	3 min	
1,5 µl 5'-Primer (10 pmol)	95°C	30 sec	} 30 Zyclen
1,5 µl 3'-Primer (10 pmol)	55°C	15 sec	
2,5 µl 10x Thermo-Polymerase-Puffer	72°C	30 sec	
0,5 µl dNTPs (10mM)	72°C	7 min	
0,2 µl Taq-DNA-Polymerase (5 kU/ml)	4°C	∞	
ad 25µl ddH ₂ O			

4.2.2.7 Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Die Reverse Transkriptase-Reaktion zur Herstellung von cDNA wurde mit dem Omniscript RT Kit von Qiagen auf Gesamt-RNA durchgeführt. Für die Reaktion wird die Aktivität des retroviralen Enzyms Reverse Transkriptase (RT) genutzt. Als Primer wurden Oligo-dT-Primer genutzt, um nur polyadenylierte RNA revers zu transkribieren. Für die Reaktion wurden 1-2 µg Gesamt-RNA in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und zu folgendem Ansatz gegeben:

1 µl RNasin
0,5 µl Oligo-dT-Primer (10 pmol)
2 µl RT-Puffer
2 µl dNTPs (5 µmol)
1 µl Omniscript
3,5 µl RNase-freies Wasser

Der Ansatz wurde 60 min bei 37°C inkubiert und in der folgenden PCR wurden 2,5 µl RT-Reaktionsansatz eingesetzt.

4.2.2.8 Real-Time PCR

Zur quantitativen Bestimmung der mRNA-Expression wird die *Real-Time* PCR eingesetzt. Hierbei handelt es sich um ein PCR-Verfahren, in dem die Amplifikation und Detektion eines PCR-Produktes simultan ablaufen. Zur Detektion der PCR-Amplifikate wurde *SYBR-Green* als Farbstoff eingesetzt. Er bindet am Ende der Elongationsphase an die kleine Furche des doppelsträngigen PCR-Produkts und besitzt ein Extinktions- und Emissionsmaximum von 480 nm und 520 nm (Wittwer *et al.*, 1997). Zur Bestimmung unterschiedlicher *Template*-Mengen bei gleicher PCR-Effizienz wird der C_P -Wert herangezogen. Er ist definiert als der Zeitpunkt, an dem die Signale der PCR-Produkte das Hintergrundrauschen überschreiten. Für die relative Quantifizierung der mRNA-Expression werden die C_P -Werte des Zielgens mit denen eines konstitutiv expremierten „Haushaltsgens“ ins Verhältnis gesetzt.

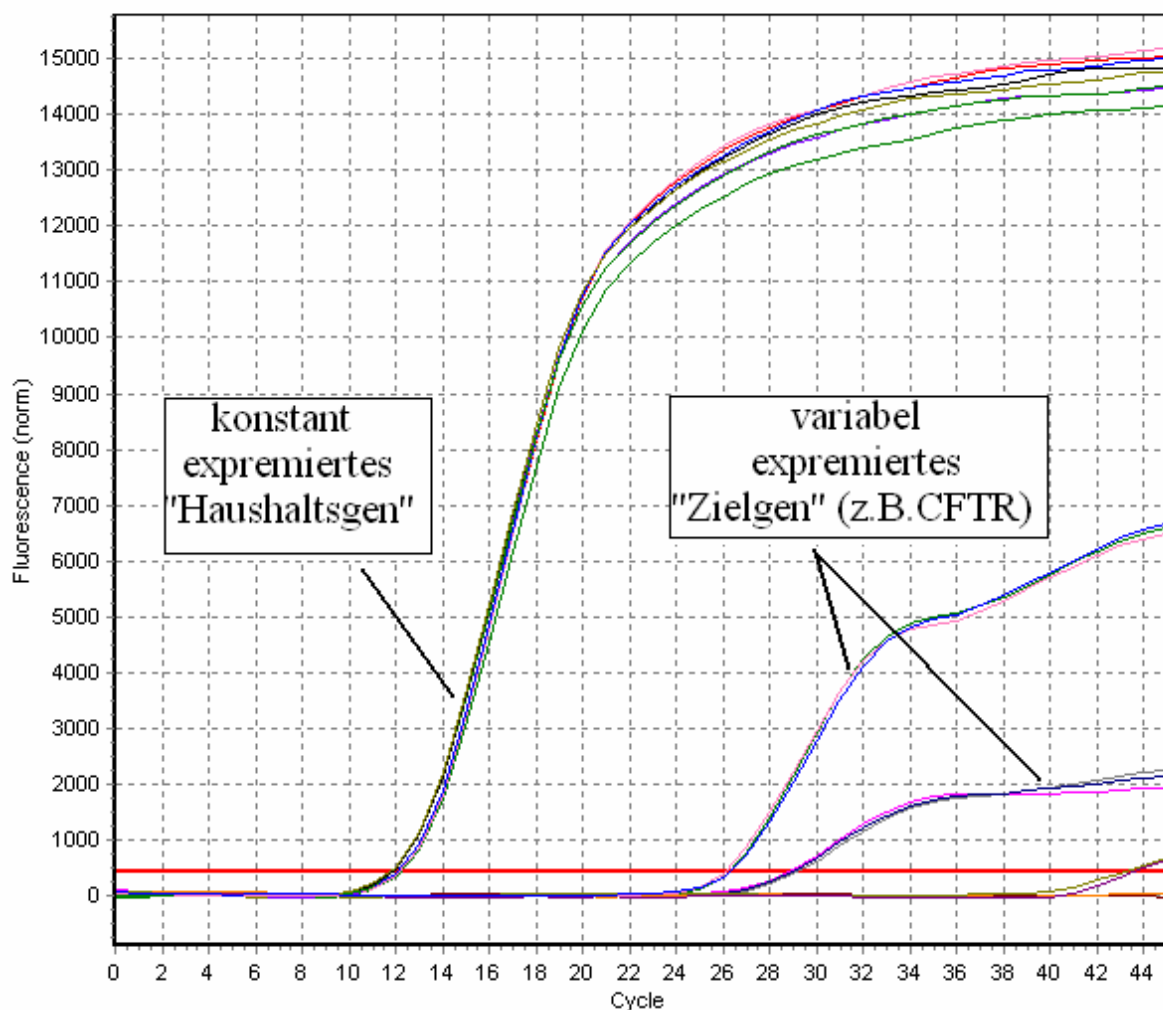


Abb.6: Schematische Darstellung einer *Real-Time* PCR zur Detektion des relativen mRNA-Gehalts eines „Zielgens“ (Eppendorf, Hamburg)

Die Messungen wurden auf dem *Mastercycler ep realplex*-System (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Als Referenzgen diente β -Aktin.

Für die *Real-Time* PCR wurden folgender Standard-Ansatz und Programm verwendet:

10,0 μ l Platinum *SYBR Green* qPCR SuperMix-UDG (3mM $MgCl_2$)

0,5 μ l 5'-Primer (25 μ mol)

0,5 μ l 3'-Primer (25 μ mol)

4,0 μ l H_2O

5,0 μ l *Template*

50°C	2 min		Uracil-N-Glykosidase Verdau
94°C	2 min		Aktivierung der Platinum-Taq-DNA-Polymerase
94°C	5 sec	} 45 Zyklen	Denaturierung
55°C	10 sec		<i>Annealing</i>
72°C	15 sec		Elongation
30°C	30 sec		Kühlen

4.2.2.9 Agarosegelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Fragmente erfolgt in mit Ethidiumbromid versetzten 1,5%igen Agarosegelen in TAE-Puffer bei 90 Volt. Die aufgetrennten Fragmente wurden im Transilluminator (312 nm) detektiert.

4.2.2.10 Reinigung von PCR-Produkten aus Agarosegele

Die entsprechende Bande wurde mit einem sterilen Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Reinigung der PCR-Produkte erfolgte mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen. Zu der ausgeschnittenen Bande wurde das dreifache Volumen an Puffer QX1 und 30 μ l QIAEX II hinzugegeben und für 10 min bei 50°C inkubiert. Das Schmelzen der Agarose und die Adsorption der DNA wurde durch zwischenzeitliches Vortexen des Ansatzes beschleunigt. Anschließend wurde für 30s zentrifugiert (13000g) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde einmal mit 500 μ l Puffer QX1 gewaschen (13000g/30 s) und

dann zweimal mit 500 µl Puffer PE. Das Pellet wird luftgetrocknet und zur Elution der DNA in 20 µl Aqua dest. gelöst, 5 min bei RT inkubiert und sedimentiert (13000g/30 s). Der Überstand enthält die gereinigte DNA.

4.2.2.11 TOPO TA-Klonierung

Die für die Sequenzierung nötige Klonierung, der bei der RT-PCR erhaltenen PCR-Produkte, erfolgte mittels des TOPO TA Cloning[®] Kits (Invitrogen). Hierbei wird durch eine kovalent an den linearisierten Vektor gebundene DNA Topoisomerase I (TOPO) das PCR-Produkt in den Vektor kloniert. Hierbei wurde folgender Standardansatz genutzt:

2 µl	PCR-Produkt
1 µl	Salzlösung
3 µl	steriles Wasser
1 µl	TOPO [®] -Vektor

Der Reaktionsansatz wurde gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Vektor in chemisch kompetente *E. coli* transformiert (siehe 4.2.2.2).

4.2.2.12 Sequenzierung

Zur Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte wurde das BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Reacting Kit von Applied Biosystems genutzt.

Hierbei wurden fluoreszenzmarkierte dNTPs eingesetzt.

Es wurde folgender Reaktionsansatz :

2,0 µl	Premix
300 ng	DNA-Template
10 pmol	Primer
ad 10 µl	H ₂ O

bei dem Temperaturprotokoll:

96°C	55 sec	} 30 Zyklen
50°C	45 sec	
60°C	4 min	
4°C		

eingesetzt. Anschließend wurde das Reaktionsgemisch mit dem DyeEx 2.0 Spin Kit (Qiagen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt und die Sequenz computergestützt fluoreszenzoptisch ausgewertet (Abi Prism 310 Genetic Analyser).

4.2.2.13 Knock-down von Genen durch siRNA

Zur Identifikation des Hyaluronan-Exporters in Maus-Fibroblasten wurden potentielle Kandidaten mittels siRNA spezifisch ausgeschaltet und anschließend die Auswirkung auf den Hyaluronan-Export überprüft. Die siRNA wurde von Ambion, Cambridgeshire bezogen. Die murinen Fibroblasten wurden in 6well-Platten halbkonfluent ausgesät. Nach 18 Std. wurden je well 2 µl Transfektionsreagenz (siPORT Lipid, Ambion) mit 15 µl Antibiotika-freiem Quantum 333 (PAA, Kölbe) gemischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden unterschiedliche Konzentrationen an siRNA und als Kontrolle Nonsens siRNA in je 185 µl Antibiotika-freiem Quantum 333 suspendiert. Nach der vorsichtigen Vereinigung mit dem ersten Ansatz wurde für weitere 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das alte Medium durch 800 µl Antibiotika-freies ersetzt. Der siRNA-Ansatz wurde dann vorsichtig auf die Zellen getropft und die Zellen 3 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurden 3 ml Antibiotika-haltiges Medium hinzugegeben. Die Zellen und das Medium wurden nach 24, 48 und 72 Std. geerntet. Die Hyaluronanmenge im Medium wurde mittels des Hyaluronan-Assays und die Hemmung der Proteinsynthese durch Western-Blot und auf RNA-Ebene durch RT-PCR und anschließender PCR mit genspezifischen Primern bestimmt.

4.2.3 Proteinbiochemische Methoden

4.2.3.1 Solubilisierung von Membranproteinen

Zur Abtrennung der integralen Membranproteine wurden diese solubilisiert. Dazu wurden die Zellen in 2 x 0,5 ml eiskaltem PBS abgeschabt und sedimentiert (5 min/1000g). Das Pellet wurde in 200 µl Homogenisierungspuffer aufgenommen. Nach der Homogenisierung durch 3 x 10 sec Ultraschall wurden 20 µl für die Proteinbestimmung abgenommen und der Zelldebris wurde durch Zentrifugation (48000g/50 min) sedimentiert. Das Membranpellet wurde in 200 µl TIN-Puffer aufgenommen, durch Ultraschall homogenisiert und für 15 min auf Eis zur Solubilisierung der Membranproteine inkubiert. Nichtsolubilisierbare Proteine und Membranfragmente wurden durch anschließende Zentrifugation (48000g/50 min) abgetrennt. Im Folgenden konnten die solubilisierten Proteine durch SDS-PAGE getrennt und mittels Western-Blot analysiert werden.

Homogenisierungspuffer:

0,1 M NaOAc
0,2 M NaCl in ddH₂O
pH 6
1 mM EDTA
1 mM PMSF
1 µg/ml Leupeptin
1 µg/ml Pepstatin

TIN-Puffer:

0,5% (v/v) Triton X-100
50 mM Imidazol
150 mM NaCl in ddH₂O
pH 7
1 mM EDTA
1 mM PMSF
1 µg/ml Leupeptin
1 µg/ml Pepstatin

4.2.3.2 Quantitative Proteinbestimmung

Die quantitative Proteinbestimmung wurde nach Lowry (Lowry *et al.*, 1951) durchgeführt.

Reagenz A:

100 Teile 3% Na₂CO₃ in 0,1 N NaOH
1 Teil 4% Na⁺/K⁺-Tartrat in ddH₂O
1 Teil 2% CuSO₄ in ddH₂O

Reagenz B:

1 Teil Folin-Reagenz
2 Teile ddH₂O

Alle Komponenten wurden zunächst einzeln angesetzt und kurz vor Gebrauch gemischt. Von den Proben wurden Aliquots von 20 µl bestimmt. Sie wurden mit Aqua dest. auf 100 µl aufgefüllt, mit 1 ml Reagenz A versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden sie mit 100 µl Reagenz B gemischt und nach weiteren 10 min Inkubation wurde die Absorption bei 660 nm gemessen. Als Standard diente eine BSA-Verdünnungsreihe.

4.2.3.3 Methanol-Chloroform-Fällung

Um störende Einflüsse der Detergenzien der Solubilisierung der Membranproteine auf die Bandenschärfe bei der SDS-PAGE zu vermeiden und um die Proteine anzureichern, wurden die Proben mittels Methanol-Chloroform-Fällung vorbereitet (Wessel & Flugge, 1984).

Dazu wurden 100 µl der Probe mit 400 µl Methanol und 100 µl Chloroform gemischt und zentrifugiert (5 min/13000g). Die methanolische Phase wird verworfen und das Protein nach Zugabe eines Volumens Methanol sedimentiert (5 min/13000g).

4.2.3.4 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur analytischen Auftrennung von Proteinen wurde die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) genutzt (Laemmli, 1970). Hierbei werden die Proteine unter reduzierenden, denaturierenden Bedingungen, die durch β -Mercaptoethanol und Natriumdodecylsulfat herbeigeführt werden, der Größe nach aufgetrennt.

Die Polyacrylamid-(PAA)-Gele wurden nach folgendem Schema hergestellt:

	Trenngel (10%)	Sammelgel (3,5%)
H ₂ O	2,5 ml	1,9 ml
1,5M Tris/HCl, pH 8,8	1,5 ml	---
0,5M Tris/HCl, pH 6,8	---	750 µl
Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	2 ml	350 µl
SDS 10% (w/v)	60 µl	30 µl
TEMED	6 µl	10 µl
APS 10% (w/v)	40 µl	15 µl

Die Gele wurden bei 150 Volt in vertikalen Gelkammern (Invitrogen) unter Verwendung von Elektrophoresepuffer laufen gelassen.

Als Größenstandard diente der SeeBlue[®] Plus2 Pre Stained Standard (Invitrogen).

4.2.3.5 Coomassie-Färbung

Coomassie Brilliant Blue R250 dient zur Anfärbung von Proteinbanden in Größenordnungen bis 100 ng. Dazu wurden die Polyacrylamidgele für 1 Std. in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend der Hintergrund mit Entfärbelösung entfernt.

Coomassie-Färbelösung:

Coomassie Brilliantblue R250	0,25 % (w/v)
Ethanol	50,00 % (v/v)
Eisessig	10,00 % (v/v)

Entfärbelösung:

Ethanol	50,00 % (v/v)
Eisessig	10,00 % (v/v)

4.2.3.6 Western-Blot

Zur qualitativen Proteinbestimmung wurde der Western Blot genutzt (Burnette, 1981). Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit dem XCell II[™] Blot Modul (Invitrogen) auf eine PVDF-(Polyvinylidendifluorid)-Membran (Pharmacia) bei 30 Volt für 60 min transferiert. Die freien Bindungsstellen auf der Membran wurden anschließend mit Blockpuffer (5% Milchpulver in TBST (w/v)) über Nacht bei 4°C abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen von je 10 min mit TBST erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 Std. bei Raumtemperatur. Nach fünfzigminütigem Waschen mit TBST (5x Pufferwechsel) wurde der Blot wieder für 1 Std. bei Raumtemperatur mit Meerrettich-Peroxidase (HRPO) gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Nach erneutem Waschen (5x Pufferwechsel) wurden die Proteine mit Luminol-haltigem ECL-Substrat (Pierce) detektiert.

Die Antikörper wurden in folgender Verdünnung eingesetzt:

Antikörper	Verdünnung (v/v)
Ratte-anti-MRP5-IgG	1:100
Maus-anti-CFTR-IgM	1:200
Ziege-anti-Ratte-IgG-HRPO	1:5000
Kaninchen-anti-Maus-IgG-HRPO	1:10000

4.2.3.7 Hyaluronan-Assay

Puffer und Reagenzien

Puffer A 2 M NaCl
 41 mM MgSO₄*7H₂O

Puffer B Puffer A plus 0,05% (v/v) Tween 20

Blockpuffer 0,5% Milchpulver in PBS pH 7,3

Substratlösung 5 mg *o*-Phenylendiamin in 10 ml 0,1 M Citrat-Phosphat-Puffer, pH 5,3
 5 µl 30%ige H₂O₂-Lösung

HABP-Puffer 25 mM Phosphatpuffer
 1,5 M NaCl
 0,3 mM Guanidiniumhydrochlorid
 0,08 % (w/v) BSA
 0,02% (w/v) NaN₃
 ad 1l Aqua dest.
 pH 7,0

Dieser Test beruht auf der Konkurrenzbindung eines biotinylierten Hyaluronanbindepoteins (hier die G1 Domäne des Aggrecans, HABP (Stern & Stern, 1992)) zwischen auf einer Mikrotiterplatte immobilisiertem Hyaluronan und dem in der Probe befindlichen Hyaluronan. Je höher die Hyaluronankonzentration in der Probe ist, desto geringer ist die Menge des biotinylierten HABPs das an das immobilisierte Hyaluronan binden kann. Das gebundene HABP wird mittels eines Streptavidin-HRPO-Konjugates und der entsprechenden Farbreaktion quantifiziert. Als Standard dient eine Verdünnungsreihe von Hyaluronan in PBS. Um störende Einflüsse durch im FKS enthaltendes Hyaluronan zu vermeiden, wurde serumfreies Medium (Quantum 333, PAA) verwandt.

Plattenvorbereitung:

Die 96-well-Platten (Covalink-NH, Nunc) wurde mit 100 µl/well eines Gemisches aus 0,92 mg N-Hydroxysuccinimid-3-Sulfonsäure und 1 mg Hyaluronan in 5 ml H₂O und 6,15 mg 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)-carbodiimid (EDC) in 5 ml H₂O über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde 3x mit je 300 µl Puffer B und 1x mit 300 µl Puffer A gewaschen. Freie Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 300 µl/well Blockpuffer für 30 min bei 37°C abgesättigt und die Platte anschließend 3x mit 300 µl/well Puffer B gewaschen.

Auf einer zweiten Platte wurden in der Zwischenzeit 50 µl Probe bzw. Standard mit 50 µl biotinyliertem HABP 1:300 in HABP-Puffer gemischt und 1 Std. bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden dann auf die Hyaluronan-beschichteten Platten übertragen und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Nach 3x Waschen mit Puffer B wurde die Platte mit 100 µl/well einer Lösung von 100 µl Streptavidin-HRPO in 10 ml PBS/Tween 20 (0,1%,(v/v)) 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde abschließend 5x mit Puffer B gewaschen und 100 µl/well Substratlösung hinzugegeben. Nach einer Entwicklungszeit von 25 min in der Dunkelheit wurde die Absorption bei 490 nm im ELISA-Reader (Synergie HT, Biotek) gemessen.

4.2.3.8 Hyaluronan-Synthase-Assay

Die Bestimmung der Aktivität der Hyaluronan-Synthase erfolgt über die szintillatorische Messung der in hochmolekulare Hyaluronan-Ketten eingebauten [¹⁴C]-markierten Glucuronsäure. Hierzu wurden 10⁷ Zellen durch die Erhöhung der FKS-Konzentration im Medium auf 15% stimuliert und nach 5 Std. geerntet und pelletiert (1500g/10 min). Das Sediment wurde in 30 ml 4°C kalten PBS aufgenommen und die Zellen bei 4°C in der Parr-

Bombe (62 bar/15 min) aufgeschlossen (Klempner *et al.*, 1980). Anschließend wurde die Membran abzentrifugiert (115000g/25 min). Das Sediment wurde in 50 mM Tris-Malonat pH 7,0 resuspendiert (200 µg Protein/ml). Je 50 µl der Proteinsuspension wurden mit 50 µl einer Enzymsubstrat-Lösung gemischt und für 4 Std. bei 37°C in Gegenwart unterschiedlicher Inhibitorkonzentrationen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen 10% SDS-Lösung abgestoppt und die Proben durch absteigende Papierchromatographie gereinigt. Nach 24 Std. wurde die Menge des [¹⁴C]-Hyaluronan am Startfleck szintillatorisch bestimmt.

Enzymsubstrat: 8 µM UDP-[¹⁴C]-Glucuronsäure
 166 µM UDP-Glucosamin
 4 µM DTT
 20 mM MgCl₂, in 50 mM Tris-Malonat, pH 7,0

Laufmittel: 600 ml ddH₂O
 60 ml Essigsäure
 pH 5,5 mit konz. Ammoniak, ad 2 l mit Ethanol

4.2.3.9 Herstellung von Hyaluronan-Oligosacchariden

Um den Export von Hyaluronan *in vivo* verfolgen zu können, wurden Hyaluronan-Oligosaccharide hergestellt. Diese wurden dann markiert oder unmarkiert in das Zytosol von Fibroblasten geschleust, um direkt den anschließenden Export oder indirekt die Konkurrenz mit einem Exporter-Substrat verfolgen zu können. Dazu wurde Hyaluronan in Verdauungspuffer (0,1 M NaOAc, 0,15 M NaCl, pH 5,2) gelöst (1 mg/ml) und Hyaluronidase (1 U/µl) bis zu einer Endkonzentration von 10 U/mg Hyaluronan hinzugegeben. Das Gemisch wurde 1 Std. bei 37°C inkubiert und die Reaktion durch Erhitzen (10 min/100°C) gestoppt. Anschließend wurde das denaturierte Enzym abzentrifugiert (4000g/10 min). Die Hyaluronan-Oligosaccharide wurden lyophilisiert und in 50 mM NH₄HCO₃ gelöst. Die Lösung wurde auf eine MonoQ-Säule (Pharmacia) aufgetragen und per HPLC (Waters) getrennt. Die Flussrate betrug 1 ml/min. Anschließend wurden die Fraktionen über eine NAP10-Säule (Amersham, Freiburg) entsalzt. Die Größe der Hyaluronan-Oligosaccharide wurde per Massenspektrometrie bestimmt. Die Fraktionen, die Tetra-, Hexa- und Octasaccharide enthielten, wurden gepoolt und in den weiteren Experimenten eingesetzt.

Tab.3: HPLC-Programm zur Trennung der Hyaluronan-Oligosaccharide

Dauer/min	10 mM TrisHCl, pH 8,4	10 mM TrisHCl, 0,5 M NaCl pH 8,4
0-1	100%	0%
1-30	50%	50%
30-35	0%	100%
35-40	0%	100%

4.2.3.10 Fluoreszenzmarkierung von Hyaluronan-Oligosacchariden

Zur Identifikation des Transports der Hyaluronan-Oligosaccharide wurden diese an Fluorescein gekoppelt (Evanko & Wight, 1999). Die Hyaluronan-Oligosaccharide (10 mg) wurden in 8 ml Aqua dest. gelöst und zu 4 ml DMSO gegeben. Eine Mischung aus 5 µl Acetaldehyd, 5 µl Cyclohexylisocyanid und 5 mg Fluorescein in 300 µl Aqua dest. wurde hinzugegeben und das Ganze unter Rühren für 5 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden zum Reaktionsansatz 100 ml eiskaltes 1,3% Kaliumacetat/Ethanol (w/v) gegeben und der Niederschlag abzentrifugiert (1500g/10 min). Das Sediment wurde in 5 ml H₂O aufgenommen und erneut mit 50 ml 1,3 % Kaliumacetat/Ethanol (w/v) gefällt. Dies wurde wiederholt, bis der Überstand klar war. Die Oligosaccharide wurden bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

4.2.3.11 Inhibition des Hyaluronan-Exports durch Hyaluronan-Oligosaccharide

Der Einfluss von Hyaluronan-Oligosacchariden auf endogenes Hyaluronan wurde mittels metabolischer Markierung durch [³H]-N-Acetyl-Glucosamin überprüft. Dazu wurden humane Fibroblasten halbkonfluent ausgesät und nach 24 Std. wurden die Zellen mit Pinozytosemedium (DMEM, 1 M Saccharose, 10% Polyethylenglycol 600), welches Hyaluronan, Hyaluronan-Oligosaccharide oder ein Gemisch aus Glucuronsäure und N-Acetyl-Glucosamin (1:1) in einer Konzentration von 100 µg/ml enthielt, für 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie 5 min mit hypoosmotischem Medium (DMEM/H₂O 1:2 (v/v)) behandelt, um die pinozytotischen Vesikel zu lysieren. Das Medium wurde gegen neues ersetzt und 8 µCi/ml [³H]-N-Acetyl-Glucosamin zugesetzt. Nach 24 Std. wurde das Medium abgenommen und zentrifugiert (1500g/10 min). Der Überstand wurde 1:3 (v/v) mit 1,3%

Kaliumacetat/Ethanol (w/v) gemischt und das präzipitierte Hyaluronan wurde sedimentiert (4000g/15 min). Das Sediment wurde in 5 ml 50 mM Tris/HCl, pH 7,8 resuspendiert und über Nacht mit 10 mg Pronase® bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde auf eine DEAE-Sephacel-Säule gegeben und mit einem linearen Gradienten von 0-0,5 M NaCl in 50 mM Tris/HCl, pH 8,4 eluiert. Fraktionen von 2 ml wurden aufgefangen und die Menge an [³H]-Hyaluronan szintillatorisch bestimmt.

4.2.3.12 Fluoresceindiacetat-Efflux-Test

Normale und MRP5-überexprimierende HEK293-Zellen wurden trypsinisiert und mit Pinozytosemedium (RPMI, 1M Saccharose, 10% Polyethylenglycol 600) und Hyaluronan-Oligosacchariden (100 µg/ml) 15 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie 5 min mit hypoosmotischem Medium (RPMI/H₂O 1:2 (v/v)) behandelt. Danach wurden die Zellen (2x10⁶ Zellen/ml) 10 min auf Eis mit dem gleichen Volumen Fluoresceindiacetat/PBS inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert (1000g/10 min) und in eiskaltem Transportpuffer resuspendiert. Die Suspension wurde bei 37°C inkubiert und zu bestimmten Zeiten wurden Proben genommen und sedimentiert (10000g/5 min). Die Fluoreszenz des Überstandes wurde (Exzitation: 485 nm und Emission: 528 nm) im Synergy HT (Biotek) gemessen.

4.2.3.13 Hyaluronan-Export-Inhibitor Assay

Um die Auswirkung verschiedener Inhibitoren auf den Hyaluronan-Export zu testen, wurden FVB und FVB-MRP5-defiziente Zellen in einer 96well-Platte ausgesät (10⁵Zellen/well). Nach 24 Std. wurde das Medium verworfen und gegen neues ersetzt. Dieses enthielt eine serielle Verdünnung der Inhibitoren in Konzentrationen von 400 µM – 0 µM. Nach 24 Std. wurde das Medium abgenommen und der Hyaluronangehalt bestimmt. Die Messungen wurden als Dreifachbestimmung durchgeführt.

4.2.3.14 Zytotoxizitätsmessung

Um die Toxizität der untersuchten Inhibitoren auf die verwendeten Fibroblasten zu testen, wurde der Alamar Blue™-Assay genutzt. Der Test beruht auf der Reduktion des Farbstoffs von einer blauen, nicht fluoreszierenden zu einer roten, fluoreszierenden Form. Als Reduktionsmittel dienen die von der lebenden Zelle zur Verfügung gestellten Reduktionsäquivalente. Die Zellen wurden in einer 96well-Platte ausgesät (10^5 Zellen/well). Nach 24 Std. wurde das Medium erneuert und die Zellen für weitere 24 Std. mit den entsprechenden Inhibitoren inkubiert. Dann wurde dem Medium 10% Alamar Blue™-Lösung zugesetzt und nach 4 Std. wurde die Fluoreszenz (Exzitation: 530 nm und Emission: 590 nm) gemessen. Als Positivkontrolle dienten unbehandelte Zellen. Über das Verhältnis von behandelten und unbehandelten Zellen ließ sich die Toxizität der Inhibitoren ermitteln.

4.2.3.15 Pulse-Chase-Experimente mit B6 Zellen

Für die *Pulse-Chase*-Experimente wurden 5×10^6 B6-Zellen zur Stimulation der Hyaluronansynthese (Prehm, 1984) 5 % zusätzliches FKS zum Zellkulturmedium gegeben und die Zellen nach 4 Std. abzentrifugiert (150g, 10 min). Anschließend wurden sie in 3 U Hyaluronidase in 1 ml Hyaluronan-Verdauungspuffer (50 mM NaOAc, 150 mM NaCl, pH 5,5) 30 min bei 37°C inkubiert. Sie wurden erneut sedimentiert (150g, 10 min) und in 1 ml DMEM (+ 20 μ Ci [3 H]-Glukosamin für den Puls) resuspendiert und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen für den *Chase* wurden anschließend in 1 ml DMEM, 20 μ Ci [3 H]-Glukosamin (in Gegenwart oder Abwesenheit von 50 μ M Verapamil oder Zaprinast) 30 min bei 37°C inkubiert. Der Pulse wurde direkt weiterverarbeitet. Dazu wurden sie abzentrifugiert (10000g 5 min), 1x mit kaltem PBS gewaschen und in 1% (w/v) SDS suspendiert und 3 min auf 100°C erhitzt, um sämtliche Proteasen zu inhibieren. Das Lysat wurde auf eine Sephacryl S-1000 (0,8 cm x 96 cm) aufgetragen und mit Tris/HCl 0,1% (w/v) SDS eluiert. Es wurden Fraktionen von 500 μ l aufgefangen und die Menge an [3 H]-Hyaluronan szintillatorisch bestimmt.

5 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war zu zeigen, dass die Synthese und der Export von Hyaluronan in Fibroblasten durch zwei unterschiedliche Proteine bewerkstelligt werden. Das bisherige kontrovers diskutierte Modell, bei dem die membranständige Hyaluronan-Synthase selbst für den Export in Streptokokken (Tlapak-Simmons *et al.*, 1998), aber auch in Vertebraten (Pummil *et al.*, 2001) verantwortlich ist, sollte überprüft werden.

Durch umfangreiche Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass bei Streptokokken der Hyaluronan-Exporter unabhängig von der Synthase deletiert werden kann. Die für den Export verantwortlichen Gene konnten identifiziert werden (Ouskova *et al.*, 2004). Diese Exporter wiesen strukturelle und funktionale Homologien zu den Transportern der Familien der Multidrug Resistance Proteinen (MDR) und den Multidrug Resistance-Related Proteinen (MRP) in Fibroblasten auf. Der Hyaluronan-Export aus humanen Fibroblasten ließ sich durch Inhibitoren gegen diese Transporterfamilien hemmen und nach der Erstellung eines Inhibitionsprofils erwies sich MRP5 als der aussichtsreichste Kandidat für den Hyaluronan-Exporter in Fibroblasten (Prehm & Schumacher 2004).

Zuerst wurde mit Hyaluronan-Oligosacchariden versucht, den Transport von endogenem Hyaluronan und von Fluoreszein, einem MRP5 Substrat, zu beeinflussen.

Zur zweifelsfreien Identifizierung des Hyaluronan-Exporters wurde mit MRP5 der aussichtsreichste Kandidat mittels siRNA in Mausfibroblasten herunter reguliert und die Auswirkung auf den Hyaluronan-Export gemessen. Parallel wurde in MRP5-defizienten Mausfibroblasten (de Wolf *et al.*, 2007) dann nach weiteren Hyaluronan-Exportern gesucht und mit CFTR der vielversprechendste Kandidat wiederum mittels siRNA überprüft. Parallel dazu wurden an beiden Zelllinien Studien mit verschiedenen Inhibitorenklassen durchgeführt, die Aufschluss über Regulation des Hyaluronan-Exports geben sollten.

5.1 Einfluss von Hyaluronan-Oligosacchariden auf MRP5

Um die Hypothese, dass MRP5 der primäre Hyaluronan-Exporter ist, zu testen, wurden Hyaluronan-Oligosaccharide durch osmotische Lyse von makropinozytotischen Vesikeln (Rechsteiner, 1987) in MRP5-überexprimierende HEK293-Zellen eingeschleust. Als Kontrolle diente das Pinozytosemedium ohne Hyaluronan-Oligosaccharide. Anschließend wurde die Auswirkung auf den Export von Fluoreszeindiacetat, einem MRP5-Substrat,

fluorimetrisch gemessen. Wenn Hyaluronan, wie auch Fluorescein, durch MRP5 exportiert wird, sollte es zu einer Konkurrenz der beiden Substrate um den Transporter kommen. Die Exportrate von Fluorescein müsste also abnehmen. Da die HEK293-Wildtyp-Linie kein MRP5 exprimiert, kann man davon ausgehen, dass die im Vergleich zu der MRP5-überexprimierenden HEK293-Zelllinie beobachteten Unterschiede des Transports auf eine Wechselwirkung von MRP5 und den Hyaluronan-Oligosacchariden zurückzuführen ist.

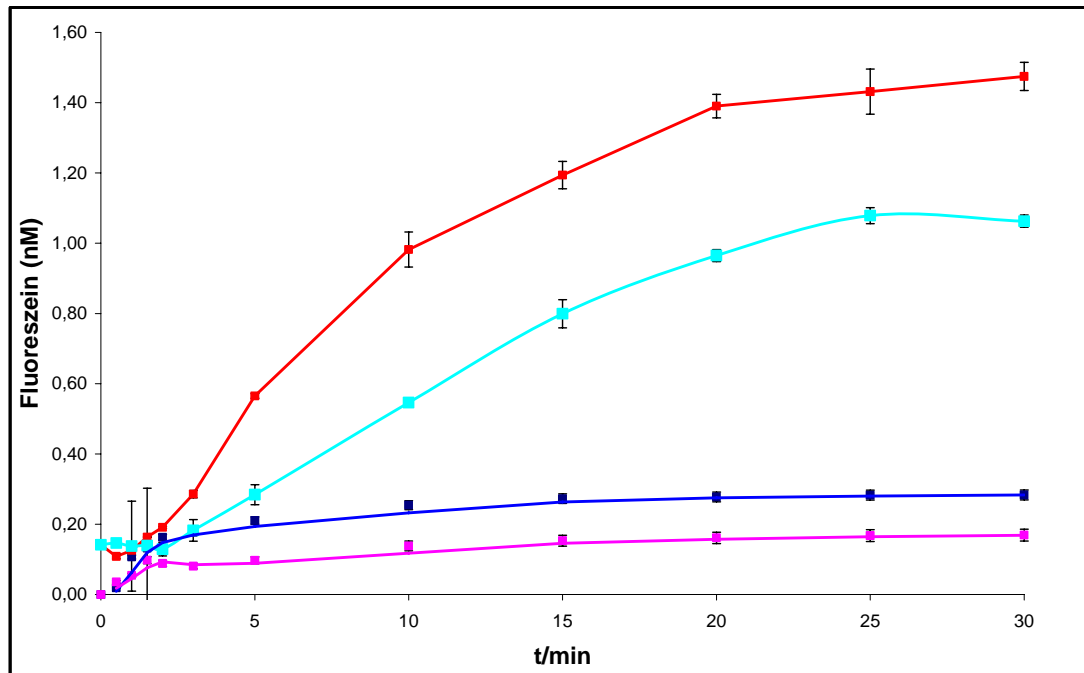


Abb.7: Beeinflussung des Exportes von Fluorescein aus MRP5 überexprimierenden HEK293 Zellen durch Hyaluronan-Oligosaccharide.

■ HEK293 Wildtyp ohne Oligosaccharide; ■ HEK293 Wildtyp + 100 µg/ml Oligosaccharide; ■ HEK293 MRP5 ohne Oligosaccharide; ■ HEK293 MRP5 + 100 µg/ml Oligosaccharide. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung drei unabhängiger Messungen. Als Kontrolle diente die HEK293 Wildtyp-Linie.

Die Oligosaccharide führten in den MRP5 überexprimierenden HEK293 Zellen sowohl zu einer insgesamt um 28% ($1,47 \text{ nM} \pm 0,04 \text{ nM}$ ohne Oligosaccharide zu $1,06 \text{ nM} \pm 0,02 \text{ nM}$ mit 100 µg/ml Oligosaccharide) geringeren Exportrate von Fluorescein als auch zu einer leicht geringeren Exportgeschwindigkeit. Die HEK293 Wildtyp-Linie zeigte kaum einen Export von Fluorescein ($0,28 \text{ nM} \pm 0,02 \text{ nM}$ ohne Oligosaccharide und $0,18 \text{ nM} \pm 0,02 \text{ nM}$ mit 100 µg/ml Oligosaccharide). Das Ergebnis zeigt, dass sowohl Hyaluronan-Oligosaccharide wie auch Fluorescein von MRP5 transportiert werden.

5.2 Einfluss von Hyaluronan-Oligosacchariden auf den endogenen Hyaluronan-Export

Um den Einfluss der Hyaluronan-Oligosaccharide auf den Export von endogen synthetisiertem Hyaluronan zu messen, wurden diese durch osmotische Lyse von makropinozytotischen Vesikeln (Rechsteiner, 1987) in humane Fibroblasten verbracht. Die Fibroblasten wurden anschließend in Gegenwart von [^3H]N-Acetyl-Glucosamin inkubiert und die Menge an [^3H]Hyaluronan im Kulturüberstand gemessen. Zum Vergleich dienten hochmolekulares Hyaluronan, ein Gemisch der Monosaccharide und Pinozytosemedium.

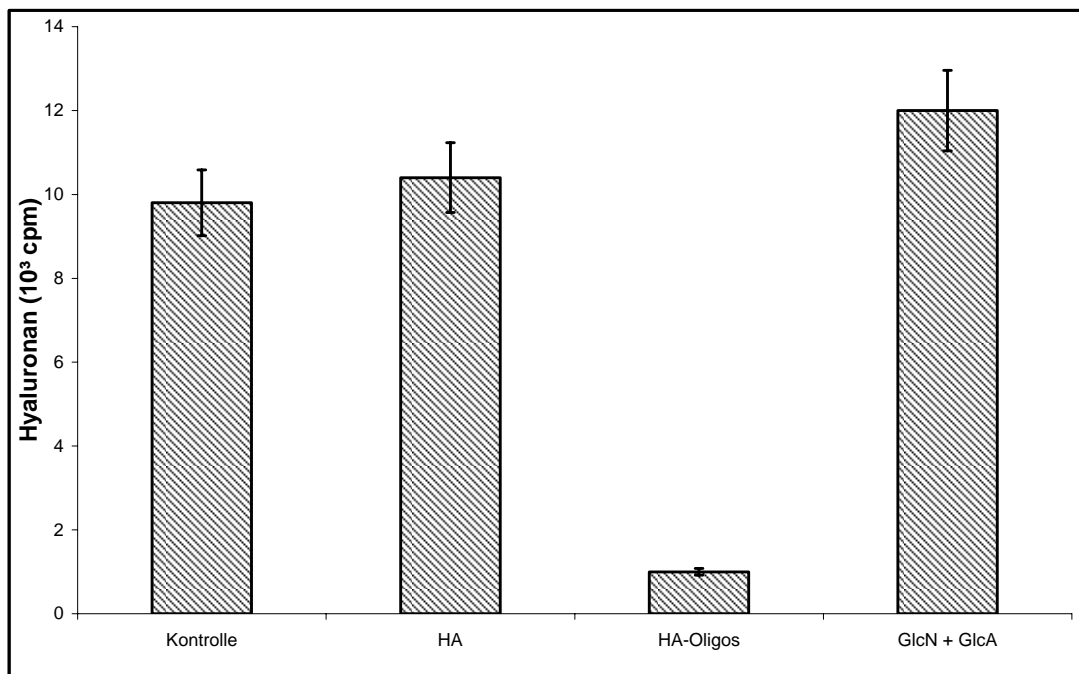


Abb.8: Auswirkung von unterschiedlich großen Hyaluronan-Fragmenten auf endogenen Hyaluronan-Export bei humanen Fibroblasten HA: Hochmolekulares Hyaluronan, HA-Oligos: Hyaluronan-Fragmente von 4-8 Disacchariden, GlcN+GlcA: äquimolare Mischung von N-Acetyl-Glucosamin und Glucuronsäure. Als Kontrolle diente die Pinozytosemischung. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung drei unabhängiger Messungen.

Das hochmolekulare Hyaluronan und die äquimolare Mischung von Glucuronsäure und N-Acetyl-Glukosamin zeigten im Vergleich zur Kontrolle keine nennenswerte Veränderung des endogenen Hyaluronan-Exportes. Hingegen führten die Hyaluronan-Oligosaccharide zu einer Verringerung des Exportes von $9800 \text{ cpm} \pm 800 \text{ cpm}$ bei der Kontrolle auf $1000 \text{ cpm} \pm 90 \text{ cpm}$ um 90%. Die Zellvitalität war bei allen vier Ansätzen unverändert, wie durch den Alamar BlueTM-Assay gezeigt werden konnte. Das Ergebnis zeigt, dass Hyaluronan-

Oligosaccharide im Zytosol mit dem endogen synthetisierten Hyaluronan um den Export konkurrieren.

5.3 Knock-down von MRP5 durch siRNA

Um MRP5 als Hyaluronan-Exporter in Fibroblasten zu identifizieren, wurde die Genexpression von MRP5 in FVB-Fibroblasten mittels spezifischer siRNA inhibiert. Dazu wurden drei kommerziell erhältliche siRNAs (siehe 4.1.6) genutzt und in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt. Als Transfektionsreagenz diente siPORT Lipid (Ambion, Cambridgeshire). Eine Konzentration von 20 nM siRNA stellte sich in Vorversuchen als am wirksamsten heraus. Höhere Konzentrationen zeigten, wie auch in der Literatur beschrieben, keine Verbesserung des Effekts (Elbashir *et al.*, 2001). Die halbkonfluent ausgesäten Fibroblasten wurden mit der siRNA transfiziert und nach 48 h und 72 h wurde die Hyaluronankonzentration im Überstand bestimmt. Gleichzeitig wurde die Auswirkung der siRNA auf die MRP5 mRNA- und Proteinexpression bestimmt. Um unspezifische Effekte auszuschließen, wurde zur Kontrolle eine Nonsense siRNA eingesetzt, die über keine Zielsequenz in der Zelle verfügte.

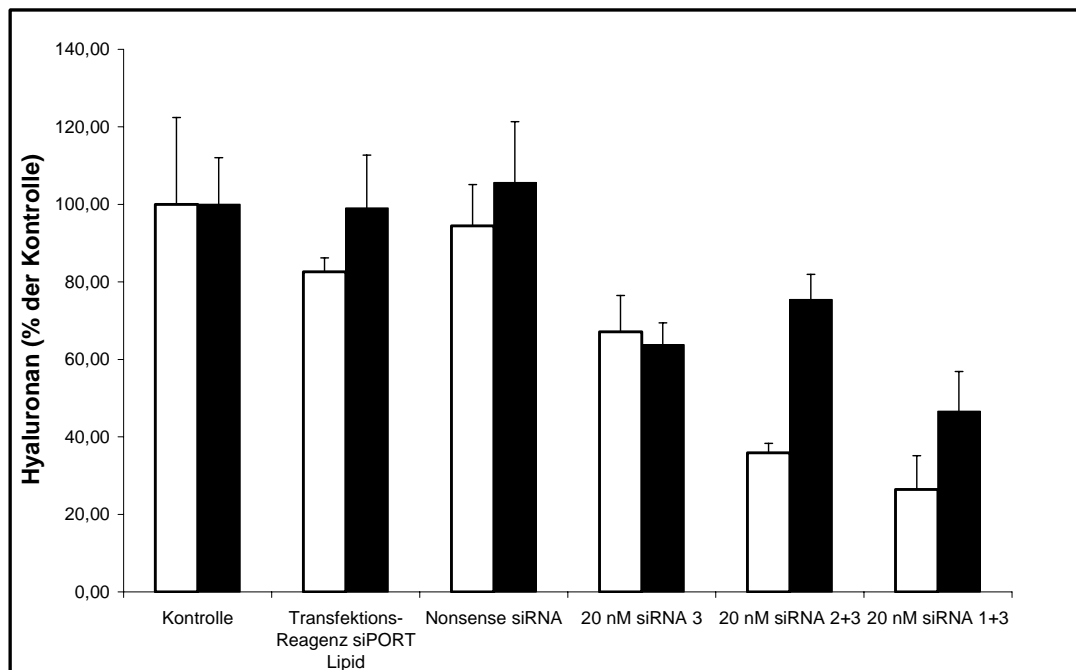


Abb.9: Effekt der MRP5 spezifischen siRNA auf den Hyaluronan-Export von FVB-Fibroblasten

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Transfektionen. ■ 48 h nach der Transfektion, □ 72h nach der Transfektion.

Von den einzelnen siRNAs stellte sich nur siRNA 3 als wirksam heraus, wenn man sie allein einsetzte. Es ergab sich eine Reduktion des Hyaluronan-Exportes auf $67\% \pm 9,4\%$ nach 48 Std. bzw $64\% \pm 5,7\%$ nach 72 Std. Die Kombinationen der siRNAs 1+3 ($26,5\% \pm 8,6\%$ nach 48 Std. und $46,5\% \pm 10,3\%$ nach 72 Std.) und siRNA 2+3 ($36\% \pm 2,5\%$ nach 48 Std. und $75\% \pm 6,5\%$ nach 72 Std.) stellten sich als wesentlich wirksamer heraus. siRNA 1 und 2 zeigte allein und in Kombination miteinander keine signifikante Hemmung. Die als Negativkontrolle eingesetzte Nonsense siRNA zeigt keine Hemmung des Hyaluronan-Exportes. Damit konnten unspezifische Effekte als Ursache des verminderten Exports ausgeschlossen werden. Das Ergebnis zeigt, dass der Einsatz von MRP5-spezifischer siRNA zu einer signifikanten Reduktion des Hyaluronan-Exports aus FVB Wildtyp-Fibroblasten führt.

Zur weiteren Überprüfung des siRNA-Effekts wurden die MRP5 mRNA- und Proteinexpression der transfizierten Fibroblasten bestimmt. Dazu wurde 48 Std. und 72 Std. nach der Transfektion mit der siRNA die mRNA mittels des RNeasy® Mini Kit (Qiagen) isoliert und anschließend mit dem Ominscript RT Kit (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde eine PCR über 25 Zyklen mit MRP5-spezifischen Primern durchgeführt. Als Kontrolle für den Expressionslevel in der Zellen diene β -Aktin.

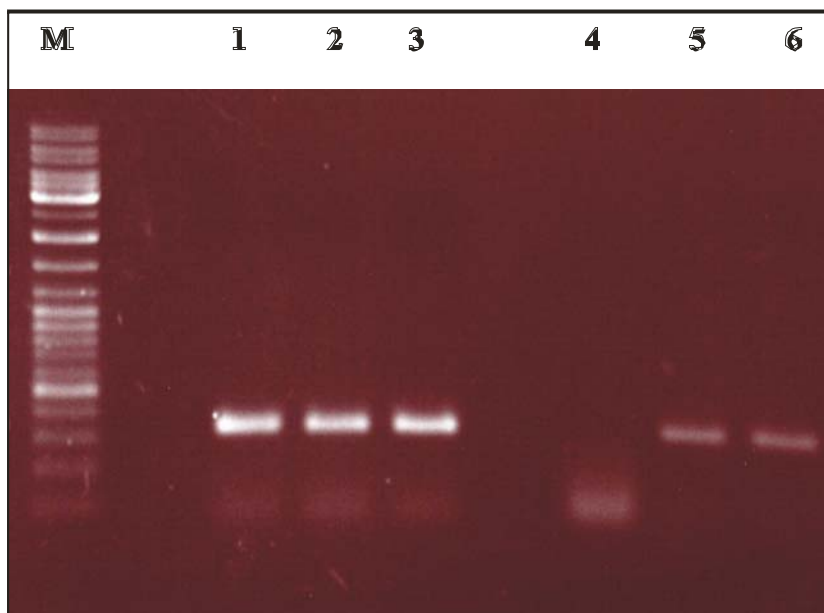


Abb.10: Einfluss von MRP5 –siRNA 1+3 auf die MRP5 mRNA-Expression von FVB-Fibroblasten

Die Proben wurden in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid visualisiert. Aufgetragen wurden: **M:** Größenstandard; **1:** β -Aktin siRNA 1+3 ; **2:** β -Aktin Nonsense siRNA; **3:** β -Aktin Kontrolle ohne siRNA; **4:** MRP5 siRNA 1+ 3; **5:** MRP5 Nonsense siRNA; **6:** MRP5 Kontrolle ohne siRNA .

Abbildung 10 zeigt, dass die Expression der MRP5 mRNA durch den Einsatz der siRNAs 1 + 3 blockiert wurde. Die Nonsense siRNA zeigt weder eine Auswirkung auf den Expressionslevel von β -Aktin, noch auf MRP5. Auch zeigen die siRNAs 1 + 3 keine Auswirkung auf die Expression der β -Aktin mRNA, die allgemeine Transkription wird also nicht beeinflusst.

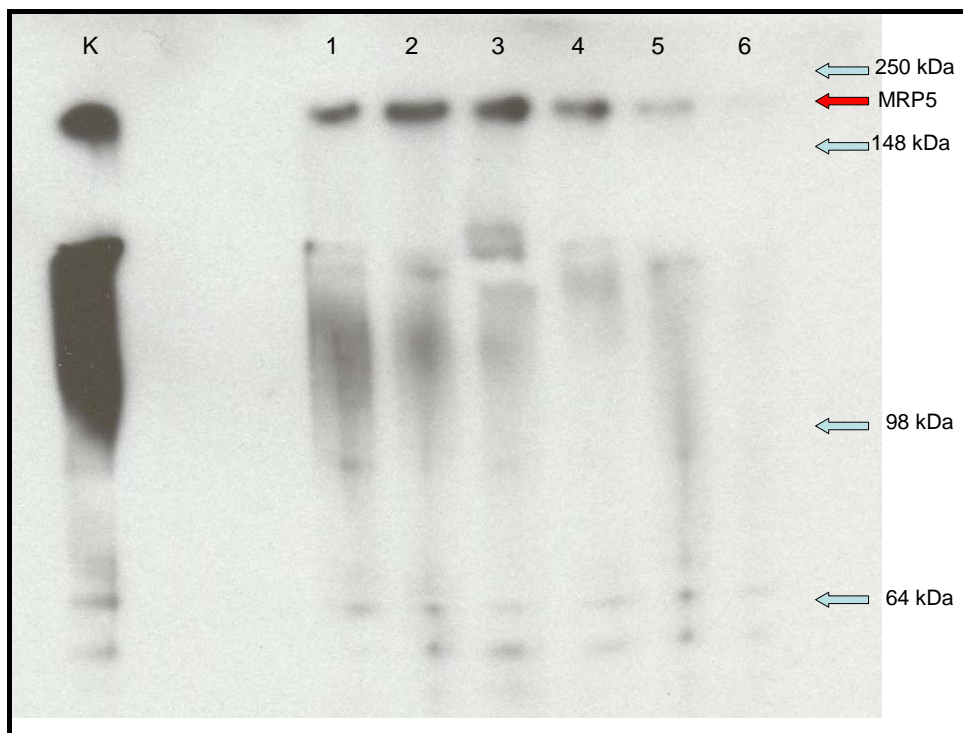


Abb.11: Western-Blot zur Analyse des Effekts der MRP5-siRNA 48h nach der Transfektion bei FVB-Fibroblasten.

Die Proben wurden in einem 7,5%igem Trenngel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Höhe der Banden des SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standards sind durch die blauen Pfeile angegeben. Aufgetragen wurden: 1: Kontrolle ohne siRNA; 2: Transfektions-Reagenz ohne siRNA; 3: Nonsense siRNA; 4: siRNA 3; 5: siRNA 2+3; 6: siRNA 1+3. Es wurden je 50 μ g Protein aufgetragen. Als Kontrolle (K) diente ein Gesamtzelllysat von MRP5 überexprimierenden HEK293 Zellen.

Der Western-Blot zeigt eine starke Abnahme der MRP5-Proteinexpression 48 Std. nach der Transfektion mit den siRNAs 1+3 und 2+3. Die Reduktion des Proteingehalts ist bei den siRNAs 1+3 am stärksten, es ist kaum noch eine Bande des bei 190 kDa erwarteten MRP5-Kanals im Western-Blot zu detektieren. Dies korreliert gut mit den Ergebnissen des Hyaluronan-Assays, der bei dieser Kombination die stärkste Reduktion des Exports feststellt. Die Bande der siRNA-Kombination 2+3 ist auch reduziert, aber noch wahrnehmbar. Bei der siRNA 3 zeigt sich kaum ein Unterschied zu den Kontrollen.

Aus diesen Befunden lässt sich schließen, dass MRP5 als der Hyaluronan-Exporter in FVB-Fibroblasten fungiert, da eine Abnahme der Proteinexpression mit einer Abnahme der Hyaluronan-Exportrate einherging.

5.4 Analyse der mRNA-Expression anderer ABC-Transporter in MRP5-defizienten FVB-Fibroblasten

Da der Export von Hyaluronan für die Mitose von Fibroblasten essentiell ist (Brecht *et al.*, 1986) und Hyaluronan-Synthase-defiziente Mäuse an Tag 9.5 *in utero* sterben (Camenisch *et al.*, 2000), MRP5-defiziente Mäuse aber keinen Phänotyp zeigen (de Wolf *et al.*, 2007), lag die Vermutung nahe, dass es zu einer Kompensation durch ein anderes Mitglied der MRP-Familie gekommen ist. Um dieses zu überprüfen, wurde die mRNA-Expression der Mitglieder der MRP-Familie (MRP1-6, CFTR und MRP8) und darüber hinaus auf MDR1, ein Mitglied der nahe verwandten MDR-Familie, gemessen. Von MDR1 war bekannt, dass es in der Lage ist, hydrophile Stoffe zu transportieren (Ambudkar *et al.*, 2003). Diese Fähigkeit machte es zu einem geeigneten Kandidaten.

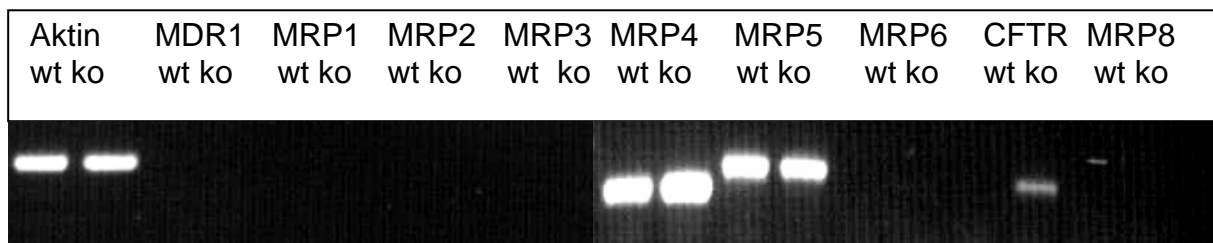


Abb.12: mRNA-Expression verschiedener ABC-Transporter in MRP5-defizienten FVB-Fibroblasten

wt: Wildtyp FVB-Fibroblasten; ko: MRP5-defiziente FVB-Fibroblasten

Die Analyse (Abb.12) ergab die mRNA-Expression von MRP4, sowohl in den Wildtyp Fibroblasten wie auch in der MRP5-defizienten Variante. Die Expression in den MRP5-defizienten Fibroblasten erschien erhöht. Die Expression der β -Aktin mRNA diente als Vergleich der Expressionslevel der beiden Zelllinien.

Erstaunlicherweise war auch eine Expression von MRP5-mRNA in den MRP5-defizienten Fibroblasten nachzuweisen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in der MRP5-defizienten Maus noch MRP5-mRNA exprimiert wird, daraus aber kein funktionelles Protein mehr

translatiert werden kann, da die für die Aminosäuren 678-745 kodierenden Basen in Exon 17 deletiert wurden (de Wolf *et al.*, 2007). Darüber hinaus war die Expression von CFTR-mRNA in den MRP5-defizienten Fibroblasten erhöht. Dies Ergebnis war sehr überraschend, da der CFTR-Kanal bisher nur als Chlorid-Exporter bekannt war. Eine Funktionsstörung dieses Kanals führt beim Menschen zu einer der häufigsten Erbkrankheit, der Zystischen Fibrose oder auch Mukoviszidose.

5.5 Real-Time PCR zur Bestimmung der CFTR- und MRP4-mRNA-Expression in MRP5-defizienten FVB-Fibroblasten

Zur Bestimmung des relativen CFTR- und MRP4-mRNA-Gehaltes wurde die mRNA mittels des RNeasy® Mini Kit (Qiagen) isoliert und anschließend mit dem Ominscript RT Kit (Qiagen) in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde dann als Template bei der *Real-Time-PCR* eingesetzt. Als interner Standard diente in diesem Fall β -Aktin.

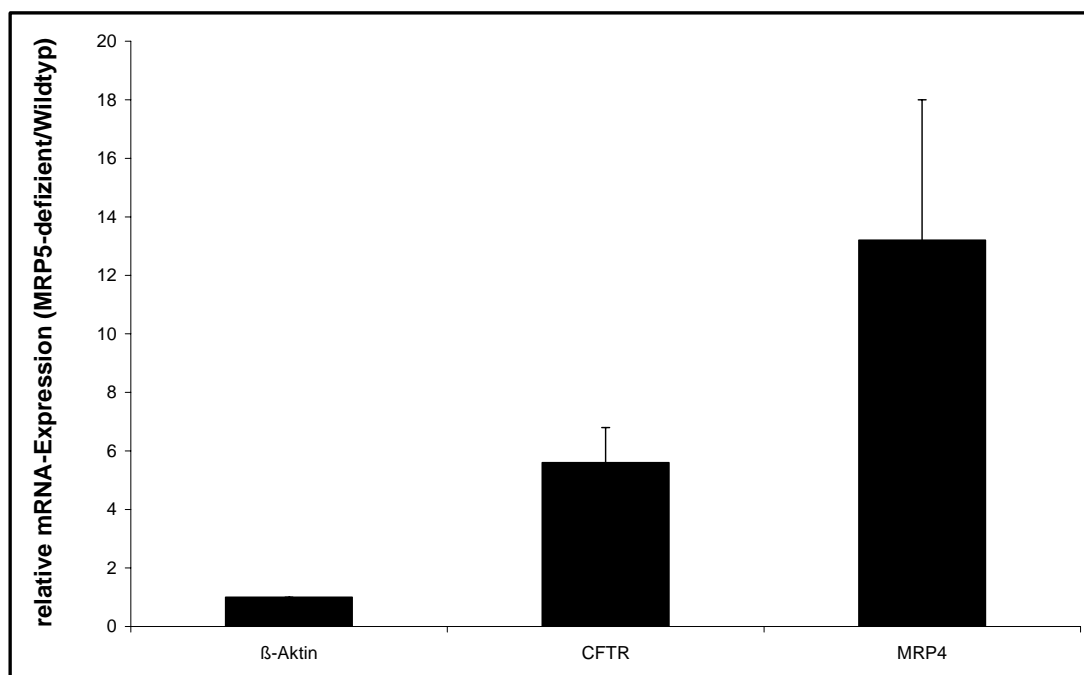


Abb.13: Analyse der CFTR- und MRP4 -mRNA-Level in MRP5-defizienten FVB-Fibroblasten

Dargestellt ist das Verhältnis der mRNA von MRP5-defiziente/Wildtyp Fibroblasten. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von drei unabhängigen Messungen.

Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung des MRP4-mRNA-Gehalts um den Faktor 13 ($\pm 4,8$) und des CFTR-mRNA-Gehalts um den Faktor 5,6 ($\pm 1,2$) in den MRP5-defizienten Fibroblasten im Vergleich zu den Wildtyp Fibroblasten. Da CFTR bisher nur als Chloridkanal bekannt war und man aber weiß, dass er *in vitro* auch Glykokonjugate transportieren kann (Mergey *et al.*, 1995), wurde im weiteren Verlauf der Arbeit überprüft, ob er als alternativer Hyaluronan-Exporter in Frage kommt. Parallel laufende Inhibitorstudien mit beiden Zelllinien zeigten eine Beteiligung von cGMP an der Regulierung des Hyaluronan-Exports. Da MRP4 aber als der Haupt cAMP-Transporter gilt (Denk *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2005) wurde er im Rahmen dieser Doktorarbeit nicht weiter untersucht.

5.6 Knock-down von CFTR durch siRNA

Um CFTR als Hyaluronan-Exporter in MRP5-defizienten Fibroblasten zu identifizieren, wurde die Genexpression auch hier mittels spezifischer siRNA inhibiert. Dazu wurden drei kommerziell erhältliche siRNAs (siehe 4.1.6) genutzt und in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt. Als Transfektionsreagenz diente siPORT Lipid (Ambion, Cambridgeshire). Eine Konzentration von 20 nM siRNA stellte sich auch hier in Vorversuchen als am wirksamsten heraus. Die halbkonfluent ausgesäten Fibroblasten wurden mit der siRNA transfiziert und nach 48 Std. und 72 Std. wurde die Hyaluronankonzentration im Überstand bestimmt. Gleichzeitig wurde die Auswirkung der siRNA auf die CFTR-Proteinexpression bestimmt. Um unspezifische Effekte auszuschließen, wurde zur Kontrolle eine Nonsens siRNA eingesetzt, die über keine Zielsequenz in der Zelle verfügte.

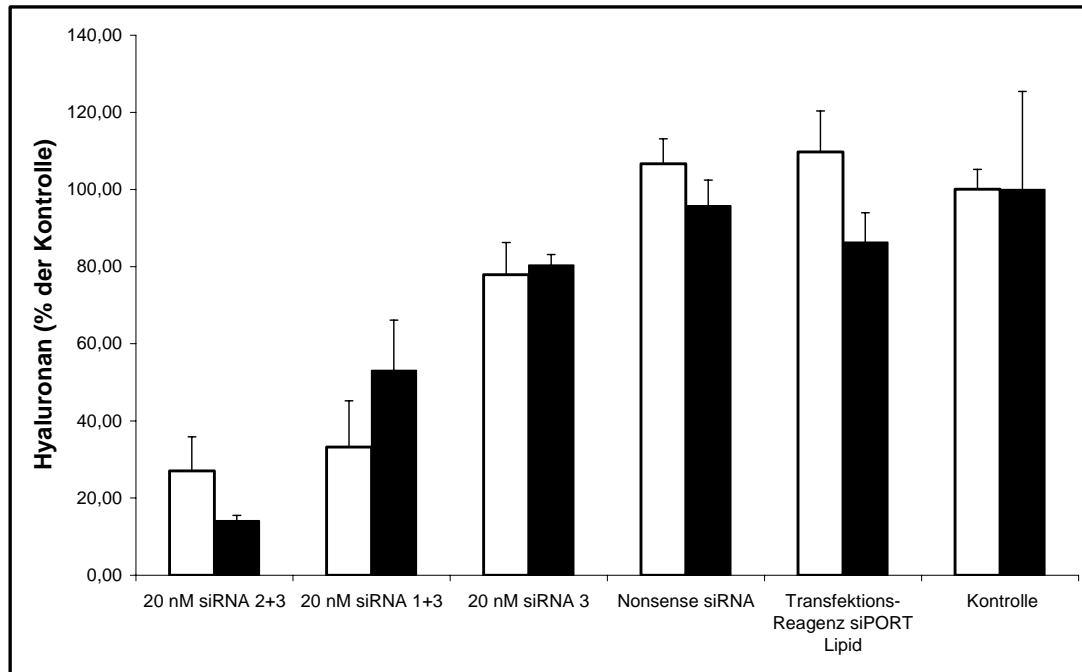


Abb.14: Effekt der CFTR spezifischen siRNA auf den Hyaluronan-Export von MRP5-defizienten FVB-Fibroblasten

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Transfektionen. ■ 48h nach der Transfektion, □ 72h nach der Transfektion.

Von den einzelnen siRNAs stellte sich nur 3 als wirksam heraus, wenn man sie allein einsetzte. Es ergab sich eine Reduktion des Hyaluronan-Exportes auf 78% ($\pm 11,8\%$) nach 48 Std. bzw 80% ($\pm 9,3\%$) nach 72 Std. Eine Kombination der siRNAs 1+3 (33% $\pm 8,8\%$ nach 48 Std. und 53% $\pm 1,3\%$ nach 72 Std.) und siRNA 2+3 (27% $\pm 9,4\%$ nach 48 Std. und 14% $\pm 2,2\%$ nach 72 Std.) stellte sich als wesentlich wirksamer heraus. Die Kombination von 2+3 stellte sich als am wirksamsten heraus. 1 und 2 zeigte allein und in Kombination miteinander keine signifikante Hemmung. Die als Negativkontrolle eingesetzte Nonsens siRNA zeigt, wie auch das Transfektionsreagenz alleine, keine Hemmung des Hyaluronan-Exportes. Damit konnten unspezifische Effekte als Ursache des verminderten Exports ausgeschlossen werden.

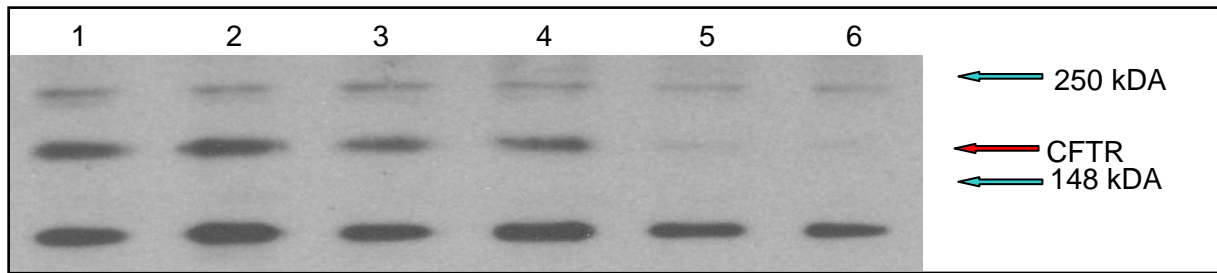


Abb.15: Western-Blot zur Analyse des Effekts der CFTR-siRNA 48h nach der Transfektion bei MRP5-defizienten FVB-Fibroblasten

Die Proben wurden in einem 7,5%igem Trenngel unter reduzierenden Bedingungen aufgetrennt. Die Höhe der Banden des SeeBlue®Plus2 Pre-Stained Standards sind durch die blauen Pfeile angegeben. Aufgetragen wurden: **1:** Kontrolle ohne siRNA; **2:** Transfektions-Reagenz ohne siRNA; **3:** Nonsense siRNA; **4:** siRNA 3; **5:** siRNA 1+3; **6:** siRNA 2+3. Es wurden je 25µg Protein aufgetragen.

Der Western-Blot zeigt eine starke Abnahme des 170 kDa CFTR-Proteins 48 Std. nach der Transfektion mit den siRNAs 1+3 und 2+3. Die Reduktion des Proteingehalts ist bei den siRNAs 2+3 am stärksten, es ist kaum noch eine Bande im Western-Blot zu detektieren. Dies korreliert gut mit den Ergebnissen des Hyaluronan-Tests, der bei dieser Kombination die stärkste Reduktion des Exports feststellt. Die Bande der siRNA-Kombination 1+3 ist auch reduziert, aber noch wahrnehmbar. Bei der siRNA 3 zeigt sich kaum ein Unterschied zu den Kontrollen. Die weiteren von dem Antikörper erkannten Banden lassen sich nicht zuordnen, sind aber laut Herstellerangaben unspezifische, nicht auf CFTR mRNA zurückzuführende Proteine. Ihre Expression unterscheidet sich in den einzelnen Proben nicht.

CFTR konnte so als Hyaluronan-Exporter in MRP5-defizienten FVB-Fibroblasten identifiziert werden, da eine Abnahme der Proteinexpression mit einer Abnahme der Hyaluronan-Exportrate einherging.

5.7 Inhibierung des Hyaluronan-Exports

5.7.1. Allgemeine Inhibitoren

Zu ersten Inhibitionsstudien wurden verschiedene Substanzen eingesetzt, die in vorangegangenen Studien mit humanen Hautfibroblasten den Hyaluronan-Export erfolgreich gehemmt haben (Prehm & Schumacher, 2004). Dazu gehörten Verapamil, ein Calciumkanalblocker, der als Herzmedikament Verwendung findet, und Benzbromaron, ein Urikosurikum, dass die tubuläre Rückresorption hemmt. Von Verapamil ist bekannt, dass es auch MDR1 hemmt und es wurde deshalb früher in der Krebstherapie eingesetzt (Dalton *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1991) und heute noch als Arrhythmikum.

Um die Bedeutung von MRP5 beim Hyaluronan-Export zu bestimmen, wurden Wildtyp FVB-Fibroblasten und MRP5-defiziente FVB-Fibroblasten miteinander verglichen. Die unterschiedlichen Inhibitorwirkungen sollten Aufschluss über die Regulation und den Ablauf des Hyaluronan-Exportes durch MRP5 und CFTR geben.

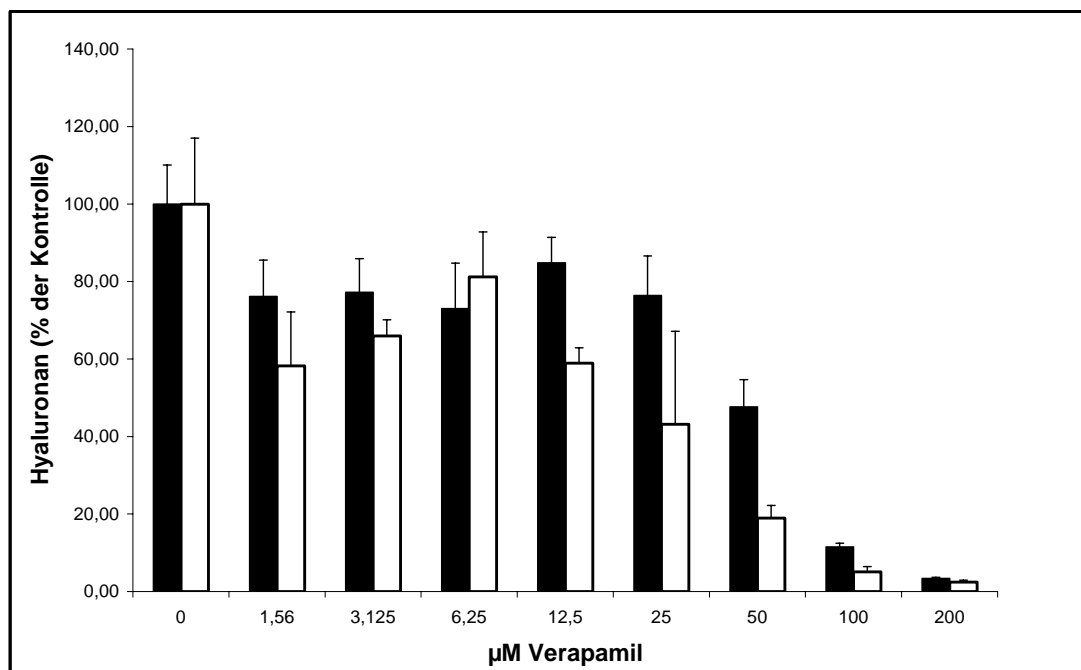


Abb.16: Effekt von Verapamil auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp und MRP5-defizienten FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ FVB-Wildtyp, □ MRP5-defiziente FVB.

Bei Verapamil zeigt sich eine deutliche Inhibition des Hyaluronan-Exportes. Der Export sinkt schon bei 25 μM Verapamil leicht auf 76% ($\pm 10,2\%$) (Mittelwert + Standardabweichung) bei den Wildtyp Fibroblasten und 43% ($\pm 24\%$) bei den MRP5-defizienten. Bei einer Konzentration von 50 μM liegen die Exportraten nur noch bei 47,7% ($\pm 7\%$) für den Wildtyp und bei 18,9% ($\pm 3,3\%$) für die Mutante. Bei 200 μM schließlich ist der Export faktisch vollständig blockiert (3,4% ($\pm 0,3\%$) für den Wildtyp und 2,4% ($\pm 0,5\%$) für die Mutante). Der IC_{50} -Wert von Verapamil für den Export von Fluoreszein durch MRP5 liegt bei 25 μM (McAleer *et al.*, 1999). Zwischen 25 und 50 μM Verapamil liegt auch hier die 50%ige Hemmung des Hyaluronan-Exportes. Die Auswirkungen auf die beiden Zelllinien unterscheiden sich kaum. Dieses Ergebnis deutet auf einen ähnlichen Wirkungsmechanismus für MRP5 und CFTR hin.

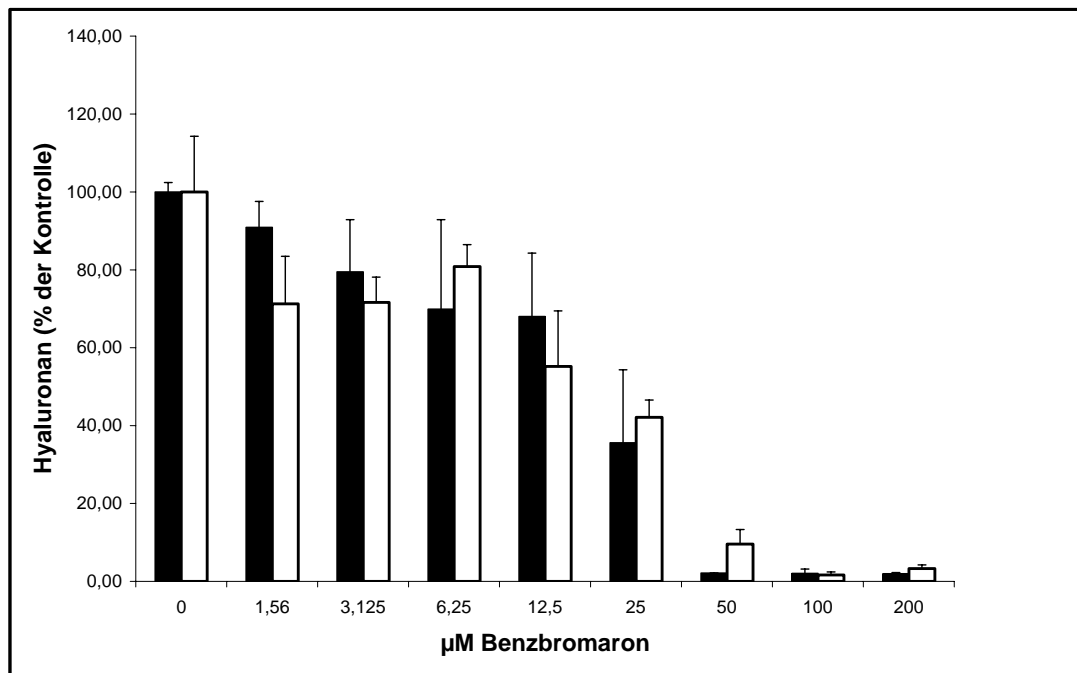


Abb.17: Effekt von Benzbromaron auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp und MRP5-defizienten FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ FVB-Wildtyp, □ MRP5-defiziente FVB.

Auch Benzbromaron, ein Urikosurikum, das sich in Vorversuchen mit humanen Fibroblasten als effektiver Inhibitor für den Hyaluronan-Export herausgestellt hatte, hemmte den Export schon in relativ geringen Konzentrationen. Bei 12,5 μM lag die Exportrate bei den Wildtyp Fibroblasten bei 68% ($\pm 16,3\%$) und bei den MRP5-defizienten Fibroblasten bei 55% ($\pm 14,2\%$) (Mittelwert + Standardabweichung). Bei 50 μM war bei Wildtyp Fibroblasten kaum

noch ein Export messbar (2,1% ($\pm 0,1\%$) bei den Wildtyp Fibroblasten und 9,5% ($\pm 3,8\%$) bei den MRP5-defizienten). Die Exportraten der beiden Zelllinien unterschieden sich aber auch hier nicht wesentlich.

5.7.2 Phosphodiesterase-Hemmer

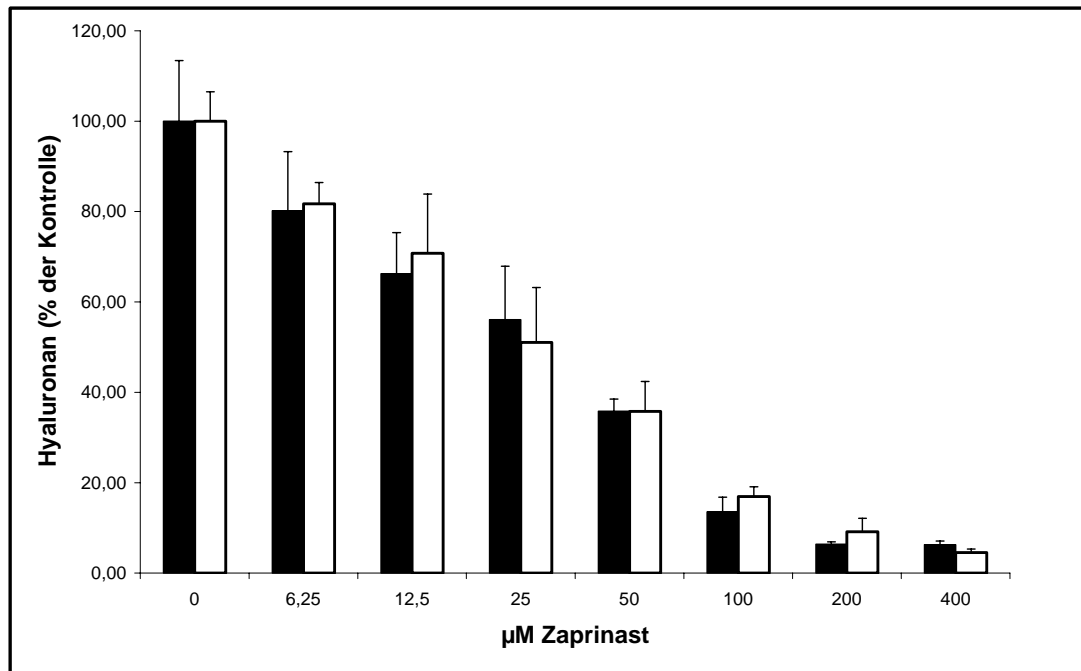


Abb.18: Effekt von Zaprinst auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp und MRP5-defizienten FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ FVB-Wildtyp, □ MRP5-defiziente FVB.

Von Zaprinst, einem Mitglied der Klasse der Phosphodiesterase-5-(PDE5)-Inhibitoren, ist bekannt, dass es auch MRP5 inhibiert. In geringen Konzentrationen inhibiert es die PDE5 (IC_{50} : 0,6 μ M, Giordano *et al.*, 2001) und in höheren Konzentrationen auch MRP5 (IC_{50} : 250 μ M, Reid *et al.*, 2003). Zaprinst inhibierte den Hyaluronan-Export schon in relativ geringen Konzentration. Schon bei einer Konzentration von 25 μ M betrug die Exportrate nur noch 56% ($\pm 11,8\%$) bei den Wildtyp Fibroblasten und 51% ($\pm 12,1\%$) bei den MRP5-defizienten (Mittelwert + Standardabweichung). Bei 100 μ M wurden nur noch 13,6% ($\pm 3,3\%$) bzw. 16,9% ($\pm 2,2\%$) exportiert. Bei 200 μ M lag die Rate bei nur noch 6,4% ($\pm 0,5\%$) und 9,1% ($\pm 3\%$). Auch eine Verdopplung der Zaprinstkonzentration auf 400 μ M führte zu keiner weiteren Reduktion des Exportes. Der Hyaluronan-Export wurde also bei

einer Zaprinastkonzentration gehemmt, die zu gering ist, als dass die direkte Hemmung des Kanals durch Zaprinast dafür verantwortlich sein könnte. Vielmehr liegt eine Beteiligung von cGMP nahe, da dieses durch die Inhibition der PDE5 nicht mehr abgebaut werden kann. Die beiden Zelllinien untereinander zeigen aber keine signifikanten Unterschiede in der Reaktion auf Zaprinast.

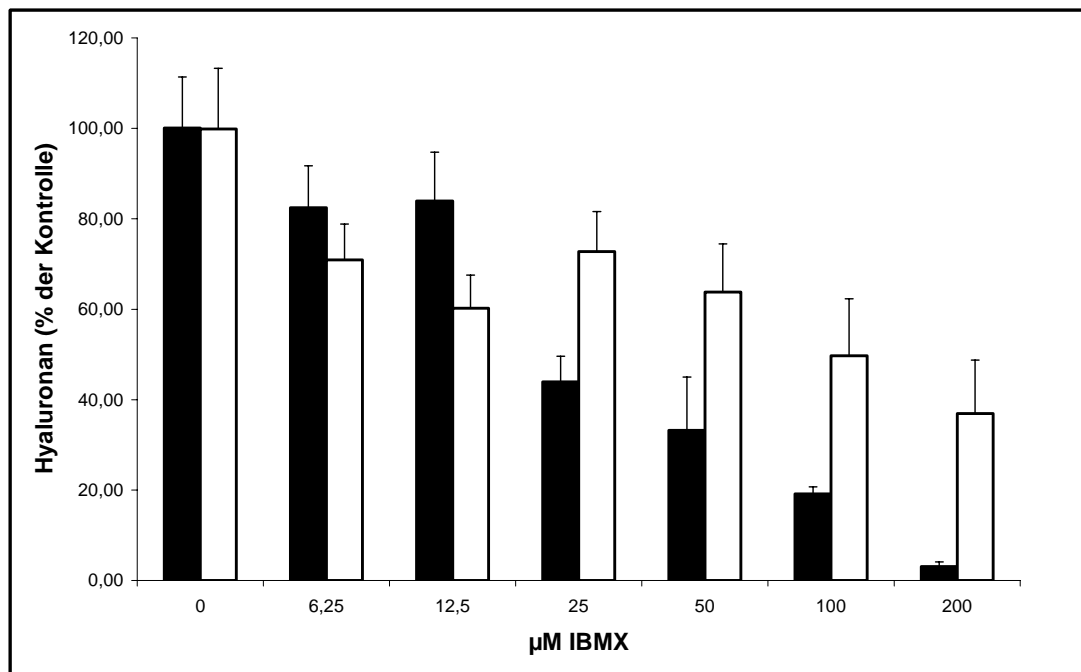


Abb.19: Effekt von IBMX auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp und MRP5-defizienten FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ FVB-Wildtyp, □ MRP5-defiziente FVB.

Der nichtselektive PDE-Hemmer IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) inhibiert die Phosphodiesterasen 4 und 5 und damit die Hydrolyse von cGMP und cAMP. Er hat aber keinerlei direkte Wirkung auf MRP5 (Jedlitschky *et al.*, 2000).

Er wurde eingesetzt, um die Hypothese zu untermauern, dass cGMP und cAMP bei der Regulation des Hyaluronan-Exportes durch MRP5 eine Rolle spielen. Es zeigten sich signifikante Unterschiede in der Inhibition des Exports zwischen den beiden Zelllinien. Bei einer Konzentration von 6,25 µM IBMX waren kaum Unterschiede zu detektieren, die Exportrate lag bei 82,4% (± 9,3%) (Mittelwert + Standardabweichung) bei den Wildtyp Fibroblasten und bei 70,9% (± 8%) bei den MRP5-defizienten. Aber die Exportrate ging bei den Wildtyp Fibroblasten von 33,2 % (± 11,8%) bei 50 µM IBMX auf nur noch 3% (± 1%) bei 200 µM zurück. Die MRP5-defizienten Fibroblasten reagierten viel weniger sensitiv auf

IBMX, die Exportrate fiel von von 63,8 % ($\pm 10,6\%$) bei 50 μM IBMX auf nur noch 36,9% ($\pm 11,9\%$) bei 200 μM . Sie lag am Ende also um eine Größenordnung höher als bei den Wildtyp Fibroblasten.

Dies weist auf eine Beteiligung von cAMP und cGMP bei der Regulierung des Hyaluronan-Exportes via MRP5 hin. Beim Export via CFTR scheint der Einfluss wesentlich geringer zu sein.

5.7.3 Manipulation des NO- und cGMP-Spiegels

Nach den ersten Hinweisen auf die Beteiligung von cAMP und cGMP an der Regulation des Hyaluronan-Exportes, wurde der Effekt eines veränderten cGMP-Spiegels auf den Export untersucht.

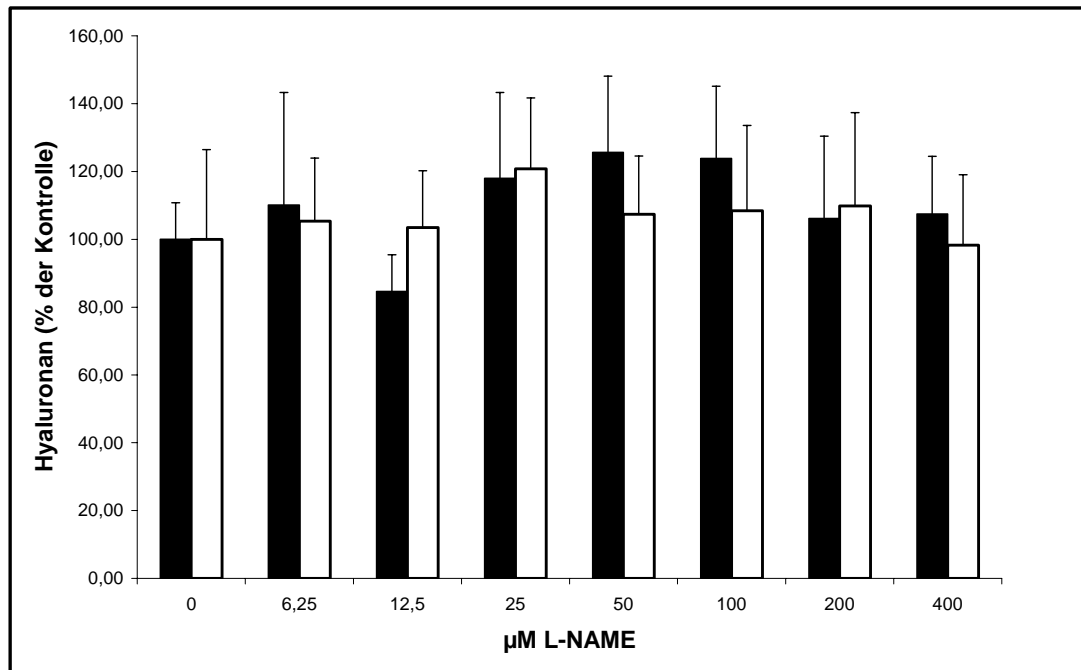


Abb.20: Effekt von L-NAME auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp und MRP5-defizienten FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ FVB-Wildtyp, □ MRP5-defiziente FVB.

Der NO-Synthaseantagonist L-NAME (N^{G} -Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester) alleine zeigte nur einen schwachen Effekt auf den Hyaluronan-Export bei Wildtyp Fibroblasten und bei der MRP5-defizienten Mutante. Es kam lediglich zu einer leichten Erhöhung. L-NAME, ein Argininanalogon, verhindert als kompetitiver Antagonist die Produktion von NO durch die in

Fibroblasten expremierte endotheliale NO-Synthase (NOS III), aber auch durch die NOS I und II. Durch das fehlende NO kann die Guanylatzyklase nicht mehr aktiviert werden, und L-NAME führt somit zu einer Reduktion des intrazellulären cGMP-Spiegels.

Da der IC_{50} -Wert von L-NAME auf die NOS III 25 μ M (Mitchell *et al.* 1993) beträgt, kann man bei 400 μ M von einer vollständigen Hemmung des Enzyms ausgehen. Doch selbst bei dieser Konzentration lag die Hyaluronan-Exportrate bei 107,5% ($\pm 17\%$) (Mittelwert + Standardabweichung) für die FVB-Fibroblasten und bei 98,3% ($\pm 20,7\%$) für die MRP5-defizienten Fibroblasten. Bei den Wildtyp Fibroblasten kam es sogar im gesamten Konzentrationsbereich zu einer Erhöhung der Exportrate. Sie erreichte bei 50 μ M mit 125,7% ($\pm 22,5\%$) ihren Höhepunkt. Die MRP5-defizienten Fibroblasten zeigten die höchste Exportrate bei 25 μ M mit 120,8% ($\pm 20,9\%$).

Eine Absenkung des cGMP-Spiegels hat also keine inhibitorischen Auswirkungen auf den Hyaluronan-Export durch den CFTR-Kanal, er wird sogar im Gegenteil leicht erhöht.

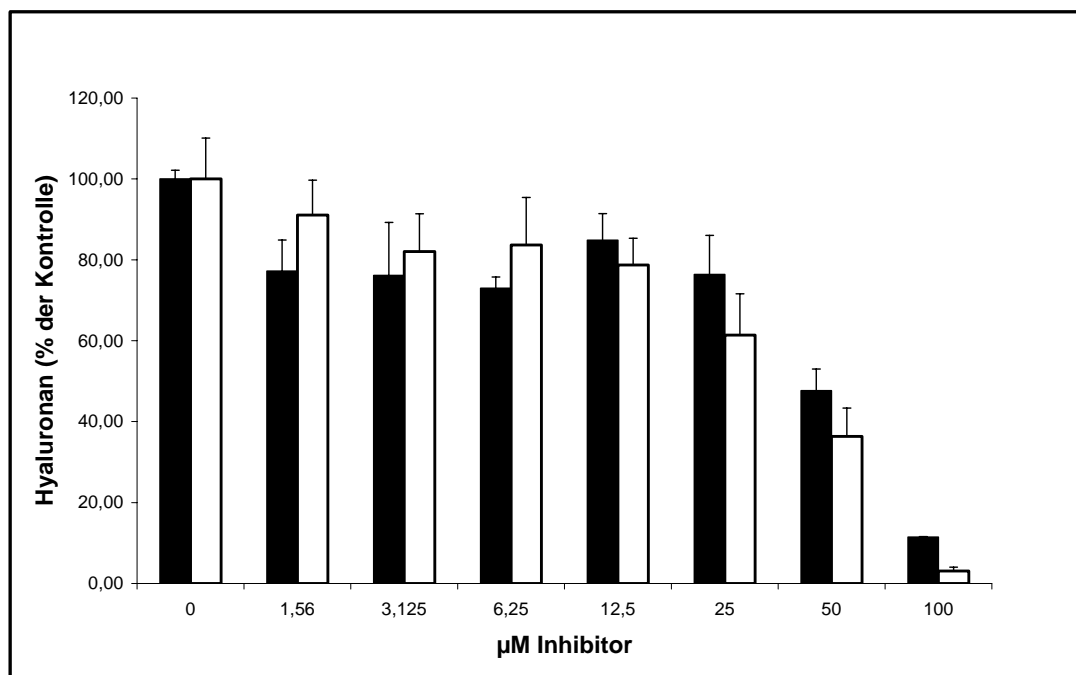


Abb.21: Effekt von Verapamil in Gegenwart und Abwesenheit von 400 μ M L-NAME auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ ohne L-NAME, □ + 400 μ M L-NAME.

Als nächstes wurde der Effekt einer Kombination von L-NAME und Verapamil überprüft. Hierbei sollte überprüft werden, ob die Hemmung des Hyaluronan-Exports durch Verapamil cGMP abhängig ist oder nicht. L-NAME wurde hierzu in einer Konzentration von 400 μ M

eingesetzt. Dies sollte die vollständige Hemmung der NOS III bewirken. Die damit einhergehende Reduktion des intrazellulären cGMP-Spiegels führte zu keiner Änderung des Inhibitionsprofils von Verapamil bei den Wildtyp Fibroblasten. Die Hemmung des Hyaluronan-Exportes durch Verapamil scheint also nicht cGMP-abhängig zu verlaufen. Auch ein Fehlen des *second messengers* cGMP wirkt sich nicht auf den Export aus.

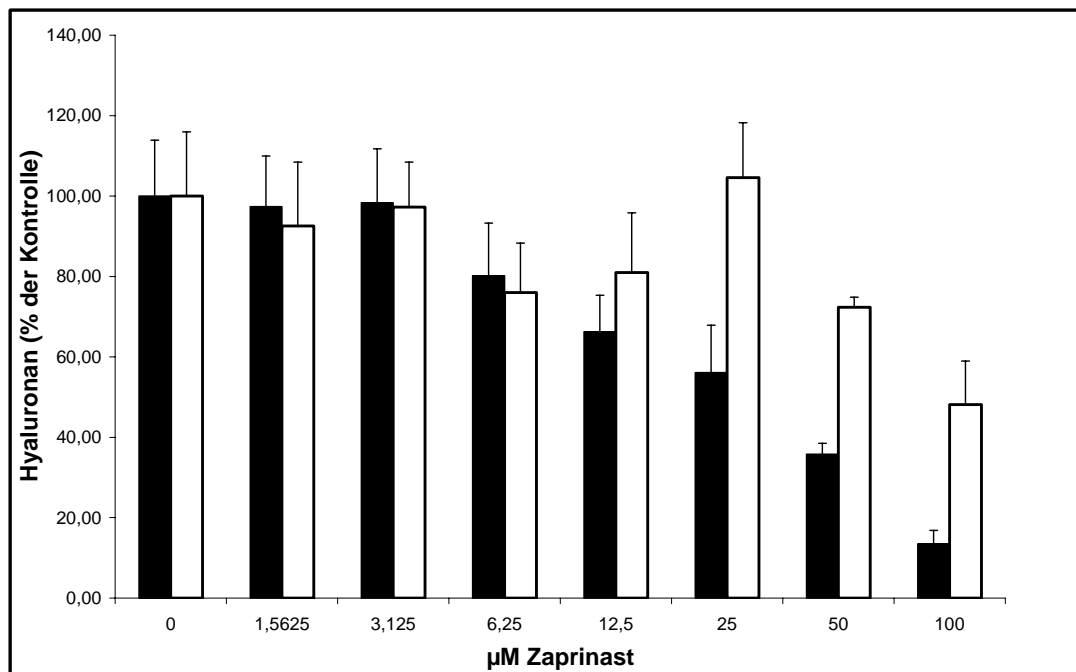


Abb.22: Effekt von Zaprinstat in Gegenwart und Abwesenheit von 400µM L-NAME auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ ohne L-NAME, □+ 400µM L-NAME.

Bei einer Kombination von L-NAME und Zaprinstat hingegen kommt es zu signifikanten Unterschieden im Inhibitionsprofil. Zaprinstat, ein Inhibitor der Phosphodiesterase 5 (PDE5) verhindert den Abbau von intrazellulärem cGMP. Bis zu einer Konzentration von 25 µM Zaprinstat kommt es praktisch zu keiner Inhibition des Hyaluronan-Exportes ($104,5\% \pm 13,7\%$). Zaprinstat alleine hingegen führt bei dieser Konzentration bereits zu einer Reduktion der Exportrate auf $56,1\% (\pm 11,8\%)$ (Mittelwert + Standardabweichung). Auch bei 50 µM liegt die Exportrate in Gegenwart von L-NAME mit $72,3\% (\pm 2,5\%)$ etwa doppelt so hoch wie ohne ($35,8\% \pm 2,7\%$). Bei 100 µM ist die Differenz sogar noch gravierender. Mit $48,1\% (\pm 10,8\%)$ liegt die Exportrate dreieinhalbfach so hoch wie ohne ($13,5\% \pm 3,2\%$). Dies zeigt sehr deutlich, dass Zaprinstat in niedrigen Konzentration durch die Inhibition der PDE5 und der damit einher gehenden Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels auf den Export

von Hyaluronan einwirkt. Durch ein Ausschalten der NOS III und einem daraus resultierenden künstlichen Absenken des cGMP-Spiegels mittels L-NAME wird die Wirkung von Zaprinast auf den Export größtenteils wieder aufgehoben. cGMP und nicht die Hemmung von MRP5 durch Zaprinast sorgt also für eine Reduktion des Hyaluronan-Exports. In höheren Dosen hingegen wirkt Zaprinast auch auf MRP5 und verringert so den Hyaluronan-Export direkt. Dies legt den Schluß nahe, daß cGMP den Export von Hyaluronan durch MRP5 inhibiert.

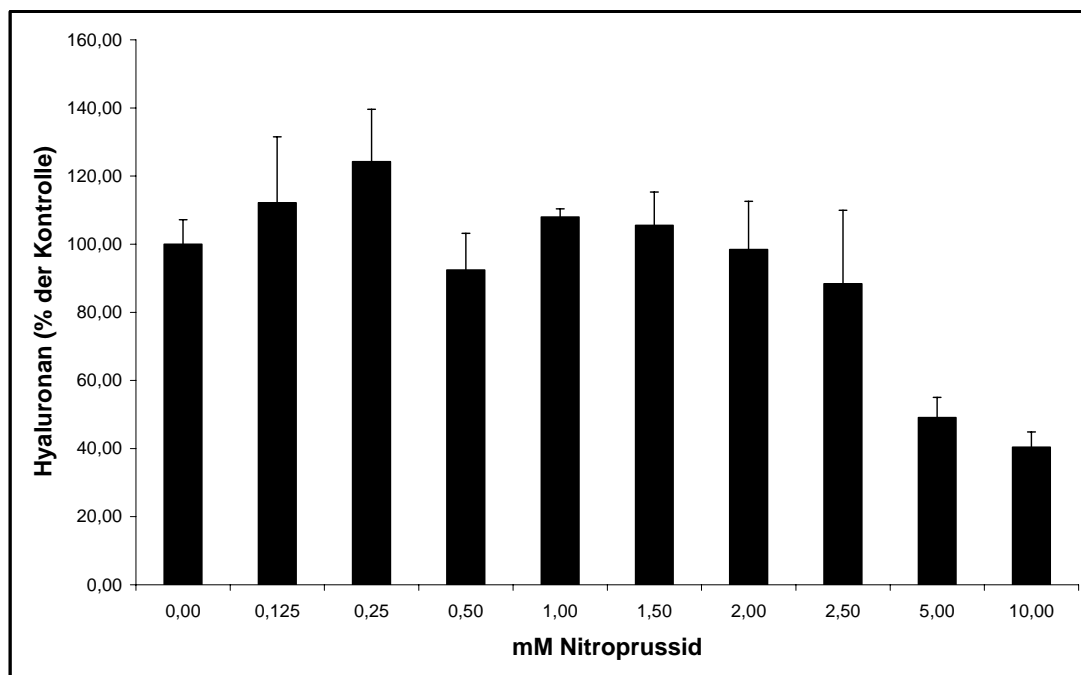


Abb.23: Effekt von Natrium-Nitroprussid auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp FVB-Zellen in Gegenwart von 400 µM L-NAME

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen.

Der exogene NO-Donor Natrium-Nitroprussid wurde genutzt, um den intrazellulären NO-Spiegel künstlich zu erhöhen und damit die Guanylatzyklase zu aktivieren. Die endogene NO-Produktion wurde gleichzeitig durch den Einsatz von 400 µM L-NAME verhindert. Bis zu einer Konzentration von 2 mM Nitroprussid zeigte sich kaum ein Effekt. Der Hyaluronan-Export lag mit leichten statistischen Schwankungen um 100%. Bei 0,25 mM gab es eine Erhöhung auf 124 % ($\pm 15,4\%$) und bei 0,5 mM eine Verringerung auf 92,4% ($\pm 10,4\%$). Erst ab 2,5 mM kam es zu einer Verringerung auf 88% ($\pm 21\%$). Bei 5 mM betrug der Export nur noch 49% ($\pm 6\%$) und fiel bei 10 mM auf 40,1% ($\pm 4,5\%$). Durch den Einsatz von exogenem NO läßt sich also der Effekt des fehlenden endogenen NO aufheben und durch die

Aktivierung der Guanylatzyklase der Hyaluronan-Export inhibieren. Allerdings ist dazu eine erhebliche Konzentration an Natrium-Nitroprussid nötig. Dies lässt sich aber über die äußerst geringe Halbwertszeit ($t_{1/2}$: 400 s in H_2O , Hakim *et al.*, 1996) von NO in wässrigem Milieu erklären. Es zerfällt schnell zu Nitrit und Nitrat und steht so für biologische Prozesse nicht mehr zur Verfügung. Es muss also eine entsprechend hohe Konzentration des exogenen NO-Donors vorhanden sein, um über einen längeren Zeitraum hinweg die Versorgung mit NO sicherzustellen.

Um die Beteiligung von cGMP am Hyaluronan-Export direkt zu untersuchen, wurde das membrangängige, hydrolyse- und phosphodiesterasebeständige cGMP-Analogon 8-Bromoguanosin-3',5'-cyclomonophosphat (Bromo-cGMP) eingesetzt.

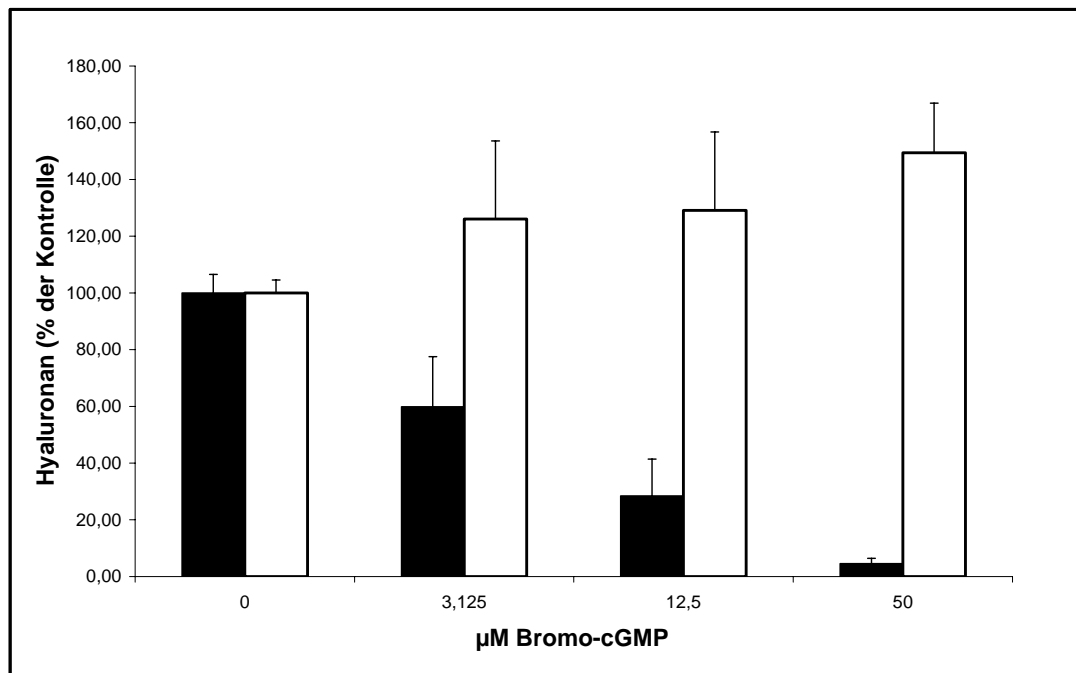


Abb.24: Effekt von Bromo-cGMP auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp und MRP5-defizienten FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ FVB-Wildtyp, □ MRP5-defiziente FVB.

Bromo-cGMP führt bei den Wildtyp Fibroblasten schon in geringen Konzentrationen zu einer Reduktion des Hyaluronan-Exports. Bei 3,125 µM werden nur noch 59,9% ($\pm 17,6\%$) (Mittelwert + Standardabweichung) exportiert, bei 12,5 µM sinkt die Rate auf 28,5% ($\pm 12,9\%$) und bei 50 µM schließlich kommt der Export mit nur noch 4,6% ($\pm 1,8\%$) fast völlig zum Erliegen. Dies zeigt die Beteiligung von cGMP an der Regulation des Hyaluronan-

Exportes. cGMP alleine ist direkt in der Lage den Hyaluronan-Export aus Wildtyp-Fibroblasten zu inhibieren.

Bei den MRP5-defizienten Fibroblasten zeigte sich genau der gegenteilige Effekt. Hier führte Bromo-cGMP zu einer Erhöhung der Exportrate. Bei 3,125 μM wurden 126% ($\pm 27,6\%$) exportiert, die Exportrate erhöhte sich bei 6,25 μM leicht auf 129% ($\pm 27,7\%$) und erreichte bei 50 μM mit 149 % ($\pm 17,6\%$) ihren Höhepunkt.

5.7.4 Manipulation des cAMP-Spiegels

Um unterscheiden zu können, ob der Hyaluronan-Export durch cGMP allein oder auch durch cAMP beeinflusst werden kann, wurde gezielt der cAMP-Spiegel der Zellen verändert. Dazu wurde zum einen die Phosphodiesterase 4 (PDE4) selektiv durch Rolipram inhibiert und so die Hydrolyse von cAMP verhindert, zum anderen wurde mittels Forskolin die Adenylatzyklase aktiviert und so der cAMP-Spiegel erhöht.

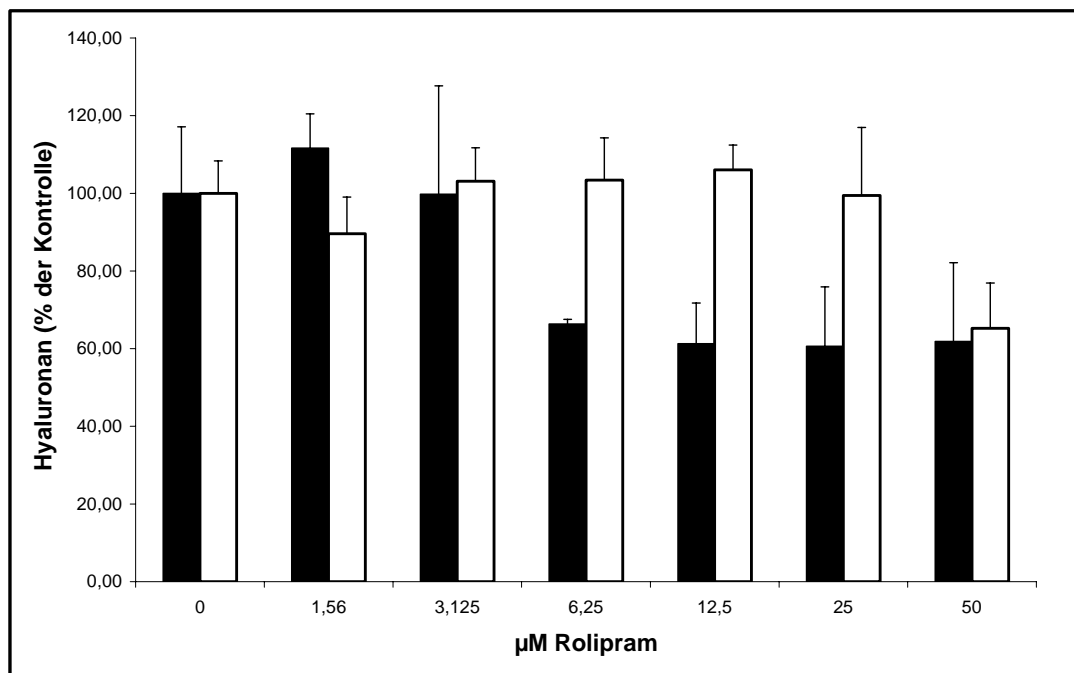


Abb.25: Effekt von Rolipram auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp und MRP5-defizienten FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ FVB-Wildtyp, □ MRP5-defiziente FVB.

Wildtyp und MRP5-defiziente Fibroblasten wurden mit dem PDE4-spezifischen Inhibitor Rolipram (IC_{50} : 300nM, Souness *et al.*, 1996) inkubiert. Bei den MRP5-defizienten Fibroblasten zeigte Rolipram bis zu einer Konzentration bis 25 μ M keinerlei Auswirkung auf den Hyaluronan-Export. Er blieb im Rahmen statistischer Schwankungen bei 100%. Erst 50 μ M zeigten eine Reduktion auf 65,2% (\pm 11,7%) (Mittelwert + Standardabweichung). Bei den Wildtyp Fibroblasten zeigte sich bis 3,125 μ M auch keine Auswirkung, ab einer Konzentration von 6,25 μ M wurde die Exportrate auf 66,3% (\pm 1,2%) gesenkt und fiel dann bis auf 61,9% (\pm 20,3%) bei 50 μ M. Dies weist auf eine Beteiligung von cAMP an der Regulation des Hyaluronan-Exportes durch MRP5 hin, wenngleich auch die Effekte des cAMPs wesentlich schwächer sind als die des cGMPs.

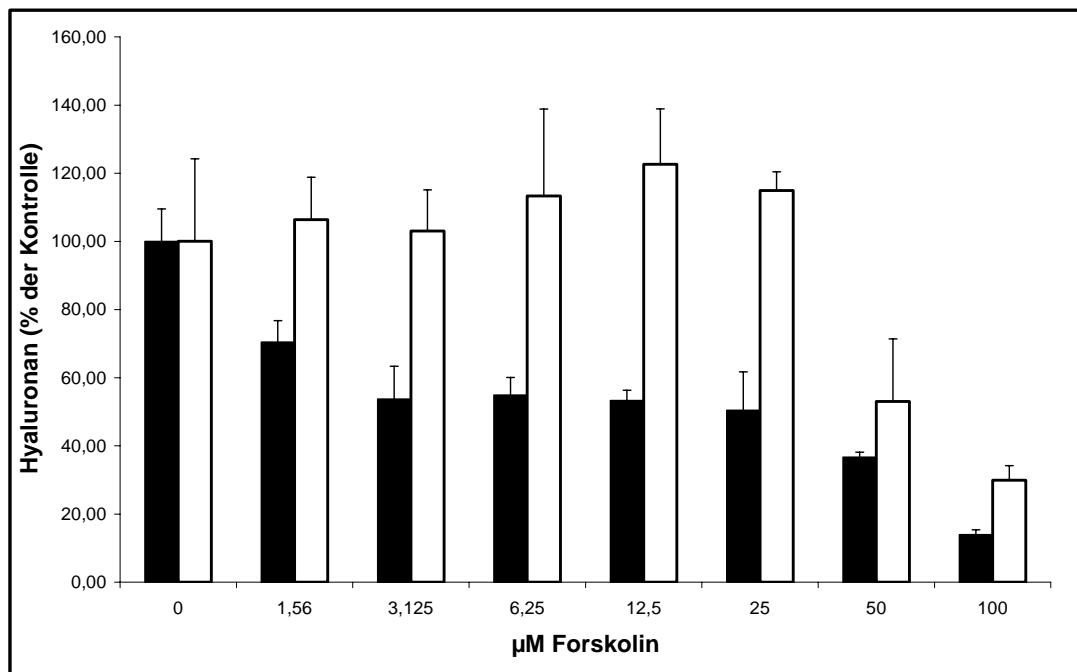


Abb.26: Effekt von Forskolin auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp und MRP5-defizienten FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ FVB-Wildtyp, □ MRP5-defiziente FVB.

Forskolin, ein Aktivator der Adenylatzyklase, zeigte bei den MRP5-defizienten Fibroblasten bis zu einer Konzentration von 25 μ M eine leichte Erhöhung des Hyaluronan-Exportes. Der Export steigt bei 12,5 μ M auf 122,6% (\pm 16,1%) und beträgt bei 25 μ M noch 115% (\pm 5,5%). Bei den Wildtyp Fibroblasten zeigte sich schon bei geringen Konzentrationen eine Verminderung der Exportrate. Bei 1,56 μ M betrug sie nur noch 70,4% (\pm 6,3%) und verringerte sich bei 3,125 μ M auf 53,8% (\pm 9,6). Bei 25 μ M schließlich betrug sie noch

50,5% ($\pm 11,2\%$). Da der EC_{50} -Wert von Forskolin für die Adenylatzyklase bei $4\text{ }\mu\text{M}$ liegt (Wie *et al.*, 2002), kann man bei $25\text{ }\mu\text{M}$ von einer vollständigen Aktivierung ausgehen. Der Export von Hyaluronan aus Wildtyp-Fibroblasten wird durch eine Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels vermindert, aber nicht vollständig inhibiert. Bei den MRP5-defizienten Fibroblasten kommt es aufgrund des erhöhten cAMP-Spiegels sogar zu einem Anstieg der Exportrate, dies könnte durch die bekannte Aktivierung des CFTR-Kanal durch cAMP erklärt werden (Pereira *et al.*, 2007).

5.7.5 Inhibition von Chlorid-Kanälen

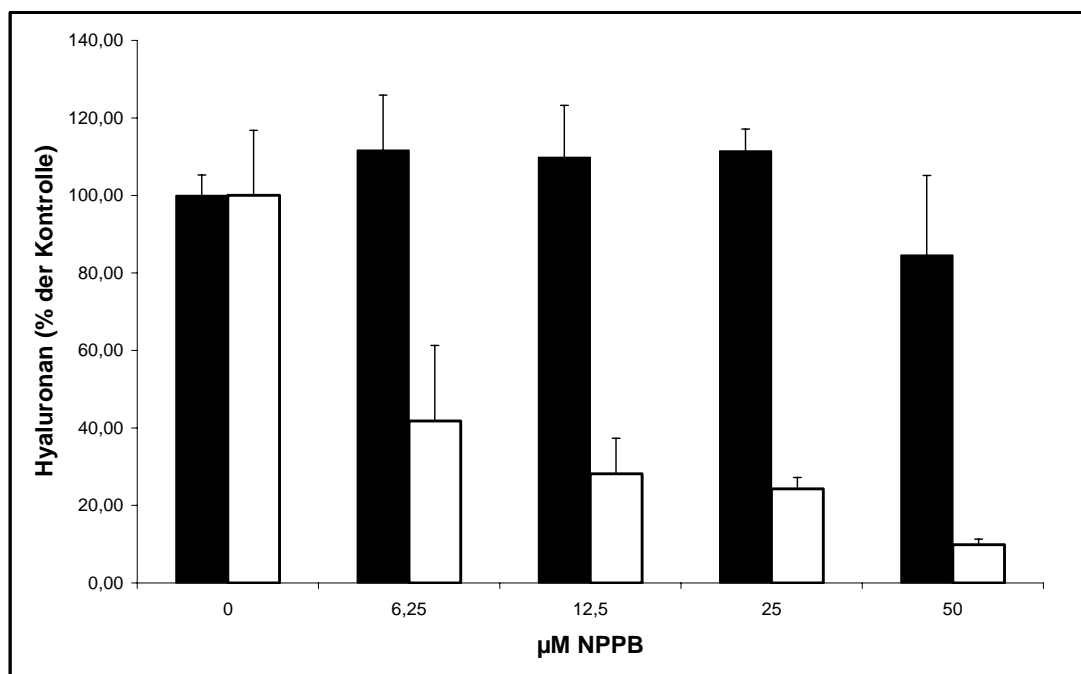


Abb.27: Effekt von NPPB auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp und MRP5-defizienten FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ FVB-Wildtyp, □ MRP5-defiziente FVB.

Das als Chlorid-Kanal-Inhibitor bekannte Arylaminobenzoat NPPB (5-Nitro-2-(3-phenyl-propyl-amino)-benzoat) zeigte eine starke Reduktion des Hyaluronan-Exportes von MRP5-defizienten FVB-Fibroblasten auf 42% ($\pm 19,5\%$) (Mittelwert + Standardabweichung) schon in geringen Konzentrationen von $6,25\text{ }\mu\text{M}$. Bei einer Konzentration von $50\text{ }\mu\text{M}$ wurde der Export auf 9,9% ($\pm 1,5\%$) reduziert, es kam also zu einer fast kompletten Inhibition des Hyaluronan-Exportes.

Bei den Wildtyp-FVB-Fibroblasten zeigte sich kaum eine Reduktion des Hyaluronan-Exports durch NPPB. Bis 25 μM NPPB waren die Werte sogar leicht erhöht ($111\% \pm 14,2\%$ bei 6,25 μM bis $114,6\% \pm 5,5\%$ bei 25 μM), sie lagen aber alle im Bereich der unbehandelten Kontrolle. Erst bei 50 μM kam es zu einem leichten Rückgang des Exportes auf $84,6\%$ ($\pm 20,5\%$).

Dies Ergebnis weist also auf die Beteiligung eines Chlorid-Kanals bei dem Hyaluronan-Export aus MRP5-defizienten FVB-Fibroblasten hin. Dieser Kanal hat aber keinen Einfluss auf den Export in Wildtyp Fibroblasten.

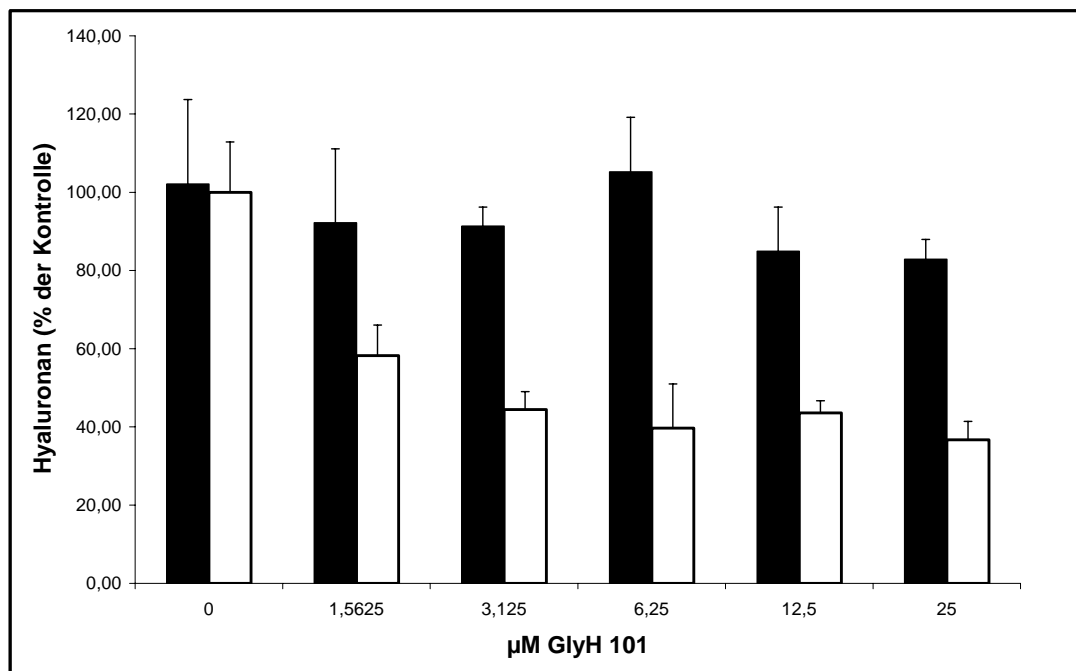


Abb.28: Effekt von GlyH 101 auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp und MRP5-defizienten FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ FVB-Wildtyp, □ MRP5-defiziente FVB.

Der CFTR-Inhibitor GlyH 101 (N-(2-naphthalenyl)-[(3,5-dibromo-2,4-dihydroxyphenyl)methylen] glyzinhydrazid) (Muanprasat *et al.*, 2004) wurde benutzt, um die Auswirkung der spezifischen Inhibition des CFTR-Kanals in den beiden FVB-Zelllinien zu testen. Der IC_{50} -Wert von GlyH 101 für den CFTR-Kanal liegt bei 4,3 μM (berechnet für den Chlorid-Efflux). Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Inhibition des Hyaluronan-Exportes bei den beiden Zelllinien. Der Export aus den FVB-Fibroblasten wurde nur schwach reduziert, er verringerte sich nur auf $82,9\%$ ($\pm 5,1\%$) bei 25 μM GlyH 101 (Mittelwert + Standardabweichung). Bei den MRP5-defizienten Fibroblasten wurde der Hyaluronan-Export

hingegen stark inhibiert, er reduzierte sich auf 36,7% ($\pm 4,7\%$) (25 μM). Es kam also zu einer Reduktion des Exports um fast zweidrittel. Dies ist in etwa die Reduktion, die auch durch die siRNA-Experimente nach 48 Std. erreicht wurde (siehe Kapitel 5.6). Auch hier zeigte sich also eine Beteiligung des CFTR-Kanals am Hyaluronan-Export aus FVB-Fibroblasten. Da GlyH 101 extrazellulär an den CFTR-Kanal bindet und nicht membrangängig ist (Muanprasat *et al.*, 2004), ist eine Wechselwirkung mit der Hyaluronan-Synthase und damit einer Verringerung des Exports aufgrund verringerter Syntheseleistung auszuschließen.

5.7.6 Pflanzliche Polyphenole

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch zwei pflanzliche Polyphenole getestet, von denen bekannt ist, dass sie mit verschiedenen MRPs wechselwirken.

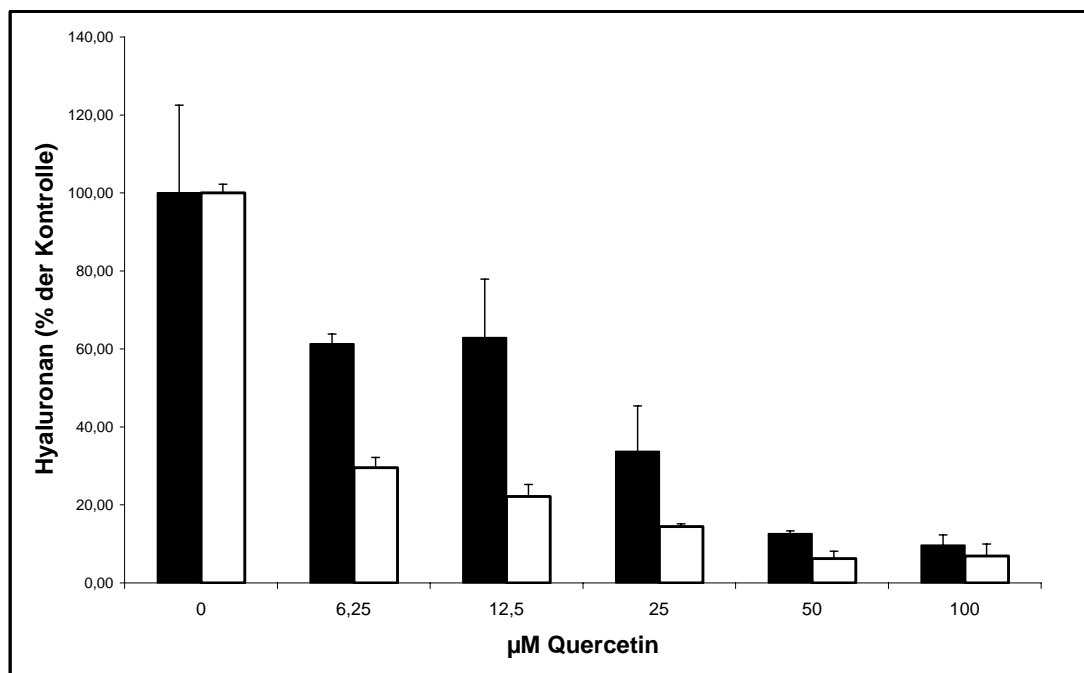


Abb.29: Effekt von Quercetin auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp und MRP5-defizienten FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ FVB-Wildtyp, □ MRP5-defiziente FVB.

Quercetin, von dem bekannt ist, dass es den Chloridexport von CFTR durch die cAMP unabhängige Aktivierung von basolateralen Kalium-Kanälen stimuliert (Cermak *et al.*, 2002) und auch MRP5 hemmt (Wu *et al.*, 2005), inhibiert schon in geringen Konzentrationen den Hyaluronan-Export in den MRP5-defizienten Fibroblasten. Bei 6,25 μM beträgt die

Exportrate nur noch 29,6% ($\pm 2,6\%$) (Mittelwert + Standardabweichung), sie fällt bei 25 μM auf 14,5% ($\pm 0,7\%$) und kommt bei 50 μM mit 6,3% ($\pm 1,8\%$) fast vollständig zum Erliegen. Die Wildtyp Fibroblasten reagieren wesentlich schwächer auf Quercetin. Bei 6,25 μM beträgt die Exportrate noch 61,3% ($\pm 2,5\%$). Sie fällt dann bei 25 μM auf 33,7% ($\pm 11,7\%$) und bei 50 μM auf 12,7% ($\pm 0,7\%$). Sie liegt also immer ungefähr doppelt so hoch wie in den MRP5-defizienten Fibroblasten. Die Reduktion des Hyaluronan-Exportes durch die Aktivierung des Chloridexportes durch CFTR ist also wesentlich stärker als die Reduktion durch Inhibierung von MRP5 (IC_{50} : 25-50 μM ; Wu *et al.*, 2005).

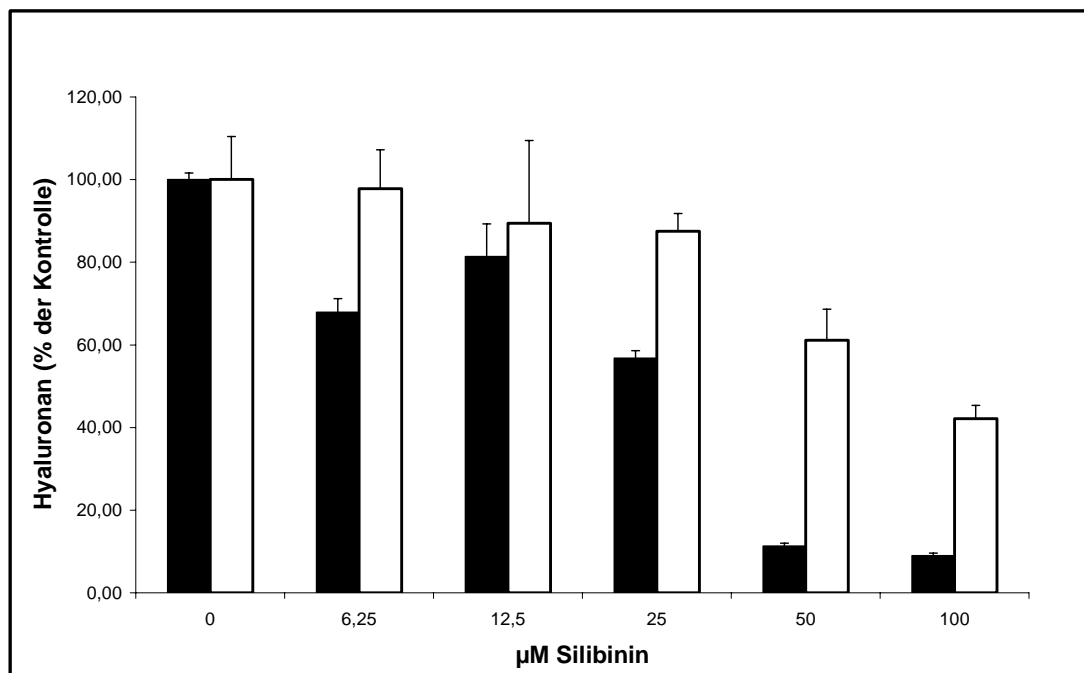


Abb.30: Effekt von Silibinin auf den relativen Hyaluronan-Export aus Wildtyp und MRP5-defizienten FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ FVB-Wildtyp, □ MRP5-defiziente FVB.

Silibinin, ein gegen Prostata- und Lebercarcinome eingesetztes Flavonoid aus Mariendistel (*Silybum marianum*), inhibiert den Hyaluronan-Export aus Wildtyp Fibroblasten wesentlich stärker als aus den MRP5-defizienten. Die Exportrate sinkt bei den MRP5-defizienten Fibroblasten nur schwach auf 87% ($\pm 4,3\%$) bei 25 μM und fällt bei 100 μM auf immerhin noch 42% ($\pm 3,3\%$). Bei den Wildtyp Fibroblasten beträgt sie bei 25 μM nur noch 56% ($\pm 1,8\%$) und fällt bei 100 μM auf 9% ($\pm 0,6\%$). Der IC_{50} -Wert von Silibinin für MRP5 beträgt 25-50 μM (Wu *et al.*, 2005). Im relevanten Konzentrationsbereich von 50-100 μM

liegt die Exportrate der MRP5-defizienten Fibroblasten also 5-6x so hoch wie die der Wildtyp Fibroblasten.

5.8 Modulation des Hyaluronan-Exportes bei Calu-3-Zellen

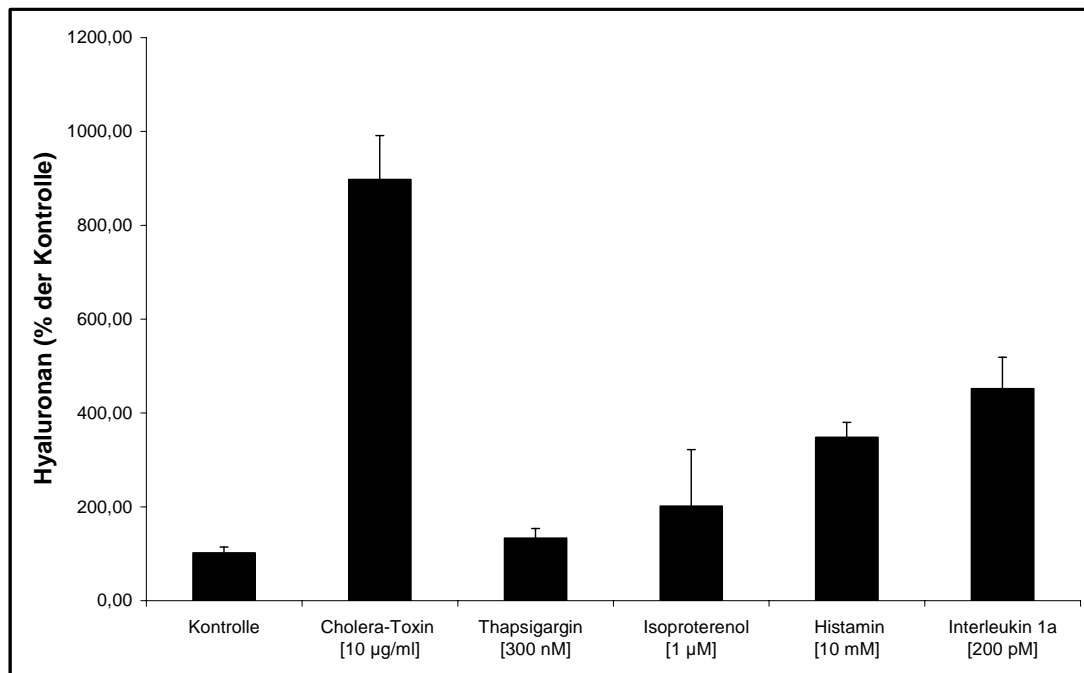


Abb.31: Einfluss verschiedener Substanzen auf den Hyaluronan-Export von Calu-3-Zellen *via* CFTR

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen.

Zur weiteren Untersuchung des Hyaluronan-Exports *via* CFTR wurden Calu-3-Zellen genutzt. Diese immortalisierten serösen Drüsenzellen produzieren Hyaluronan (Bartaniuk *et al.*, 1996). Bei ihnen konnte in Vorversuchen keine Expression von MRP5-mRNA festgestellt werden. Sie exprimieren aber große Mengen CFTR-mRNA (Haws *et al.*, 1994). Verschiedene Aktivatoren von CFTR führen in Calu-3-Zellen zu einem signifikanten Anstieg des Hyaluronan-Exportes. Cholera-Toxin, das Toxin von *Vibrio cholerae* führte zu einem Anstieg des Hyaluronan-Exportes auf 897% ($\pm 93\%$) (Mittelwert + Standardabweichung) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Cholera-Toxin aktiviert den CFTR-Kanal durch die permanente Aktivierung der Adenylatzyklase und die damit einhergehende hohe intrazelluläre cAMP-Konzentration.

Thapsigargin, ein Sesquiterpen-Lakton aus der Garganischen Pagierdolde (*Thapsia garganica*), sorgt für eine Erhöhung der zytosolischen Calciumkonzentration durch Influx von extrazellulärem Calcium (Takemura *et al.*, 1989) und erhöht die intrazelluläre cAMP-Konzentration. Es führt zu einer Erhöhung des Hyaluronan-Exportes auf 133% ($\pm 20\%$).

Isoproterenol stimuliert die intrazelluläre cAMP-Produktion (EC_{50} : 0,1 μ M, MacGregor *et al.*, 1996) und führt bei einer Konzentration von 1 μ M zu einer Erhöhung des Hyaluronan-Exportes auf 200% ($\pm 120\%$). Histamin führt zu einer Erhöhung auf 350% ($\pm 32\%$) und Interleukin 1 α , welches schon in einer parallel verlaufenden Dissertation (Deiters, 2006) seine Fähigkeit zur Verstärkung des Hyaluronan-Exportes gezeigt hatte, führte zu einer Erhöhung auf 450% ($\pm 67\%$). Diese Ergebnisse zeigen, dass CFTR für den Hyaluronan-Export aus Calu-3 Zellen verantwortlich ist.

5.9 Einfluss von Verapamil und Zaprinast auf den intrazellulären Hyaluronan-Spiegel

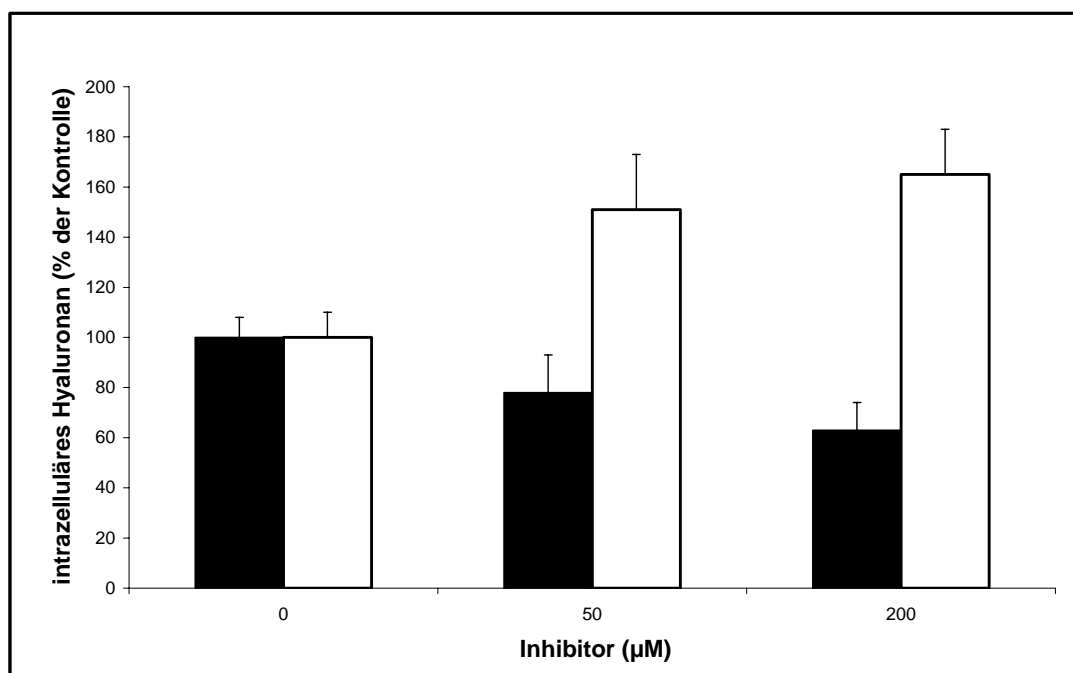


Abb.32: Effekt von Verapamil und Zaprinast auf die relative intrazelluläre Hyaluronankonzentration von FVB-Zellen

Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung der Hyaluronankonzentration im Medium drei unabhängiger Messungen. ■ Verapamil, □ Zaprinast.

Zur Überprüfung der Wirkungsweisen der unterschiedlichen Inhibitoren des Hyaluronan-Exportes wurden Fibroblasten in Gegenwart von [^3H]-Glukosamin und unterschiedlichen Inhibitorkonzentrationen 24 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen trypsinisiert und lysiert. Das enthaltene [^3H]-Hyaluronan wurde durch reverse Papierchromatographie gereinigt und die Menge an [^3H]-Hyaluronan szintillatorisch bestimmt.

Bei Zaprinast erhöhte sich die intrazelluläre Hyaluronanmenge signifikant auf 151% ($\pm 22\%$) bei 50 μM und auf 165% ($\pm 10\%$) bei 200 μM . Bei Verapamil hingegen ging die Hyaluronanmenge auf 78% ($\pm 15\%$) bei 50 μM und auf 63% ($\pm 8\%$) bei 200 μM zurück.

Verapamil führt also zu einer Abnahme des Hyaluronan-Exportes und zu einer Verringerung der intrazellulären Hyaluronankonzentration. Zaprinast führt auch zu einer Verringerung des Hyaluronan-Exportes, aber gleichzeitig zu einem Anstieg der intrazellulären Hyaluronankonzentration.

5.10 Einfluss der Inhibitoren auf die Hyaluronan-Synthase

Alle verwendeten Modulatoren des Hyaluronan-Exportes wurden auf ihre Wirkung auf die Hyaluronan-Synthase hin untersucht, um unterscheiden zu können, ob die Reduktion des Exports auf eine verminderte Synthase-Aktivität zurückzuführen ist oder nicht.

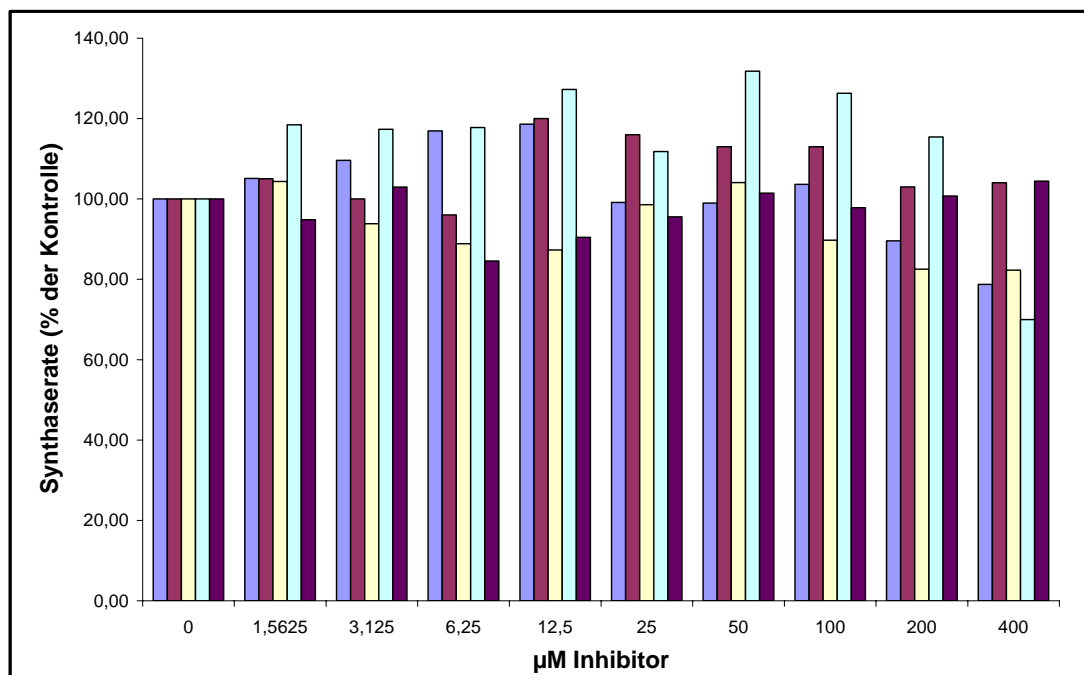


Abb.33: Einfluss der cGMP und cAMP-Spiegel modulierenden Substanzen auf die Hyaluronan-Synthase

■ IBMX; ■ Zaprinast; ■ L-NAME; ■ Rolipram; ■ Forskolin.

Hierzu wurde eine isolierte Membranfraktion der Fibroblasten in Gegenwart eines [^{14}C]-Glukuronsäure enthaltenden Substrats inkubiert und das synthetisierte [^{14}C]-Hyaluronan mittels absteigender Papierchromatographie gereinigt und szintillatorisch gemessen.

Die Modulatoren des intrazellulären cGMP- und cAMP-Spiegels zeigten kaum Auswirkungen auf die Synthese-Aktivität. Die Werte bewegten sich mit leichten Schwankungen um 100%. Rolipram führte in Konzentrationen von 1,56- 200 μM sogar zu einer leichten Erhöhung der Synthese-Aktivität. IBMX und Zaprinast zeigten ein ähnliches Resultat bis zu einer Konzentration von 100 μM .

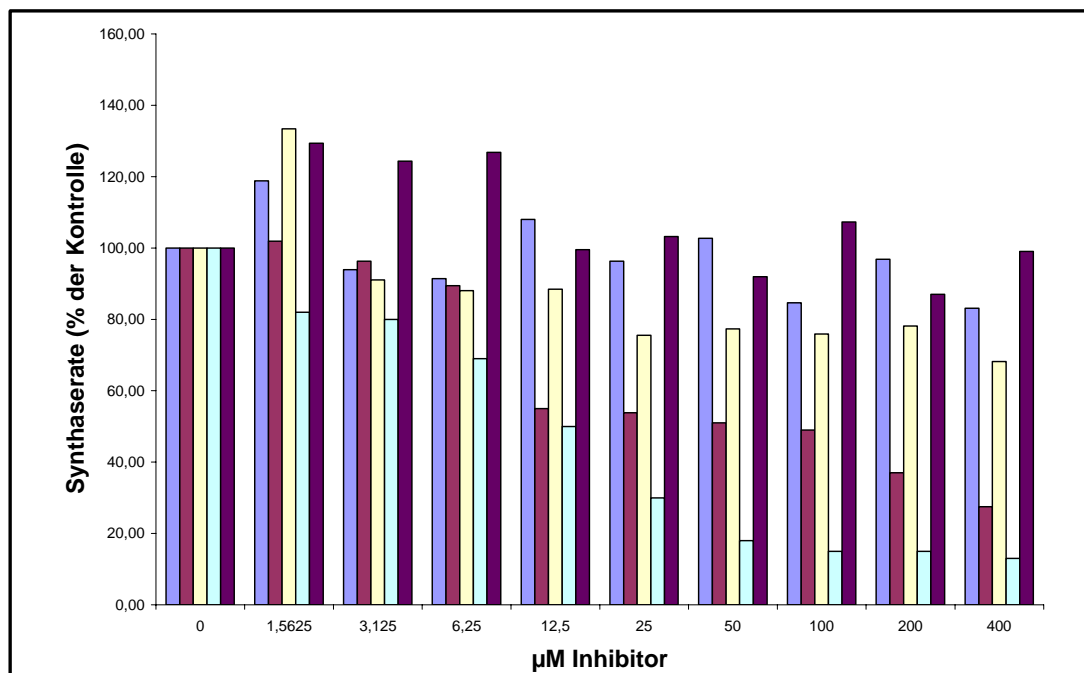


Abb.34: Einfluss der anderen verwendeten, membrangängigen Substanzen auf die Hyaluronan-Synthase

■ Quercetin; ■ Verapamil; ■ NPPB; ■ Benzbromaron; ■ Silibinin.

Von den anderen, membrangängigen Sustanzen zeigte Quercetin so gut wie keinen Einfluss auf die Hyaluronan-Synthase. Die Synthese-Aktivität schwankte um 100%. Bei 5-Nitro-2-(3-phenyl-propyl-amino)-benzoat (NPPB) kam es bei 1,56 μM sogar zu einer Erhöhung der Synthese-Aktivität auf 130%, dann fiel sie jedoch bei 3,125 μM auf 91% und bei 25 μM auf 75%. Sie erreichte bei 400 μM mit 68% ihren Tiefststand. Silibin erhöhte in Konzentration von 1,56- 6,25 μM sogar die Synthese-Aktivität auf 130%. Danach fiel sie wieder und schwankte bis 400 μM um 100%. Verapamil inhibierte die Synthase wesentlich effektiver. Bei 6,25 μM betrug die Synthese-Aktivität noch 89 %, bei 12,5 μM nur noch 55% und bei 200 μM lag sie bei 37%. Sie sank bei 400 μM schließlich auf 28 % ab. Am effektivsten wurde die Synthase aber von Benzbromaron inhibiert. Die Synthese-Aktivität betrug hier bei

1,56 μM noch 82% sank dann 12,5 μM auf 50% und bei 50 μM auf nur noch 18%. Bei 400 μM erreichte sie mit 13% den niedrigsten Wert aller gemessenen Inhibitoren.

5.11 Pulse-Chase

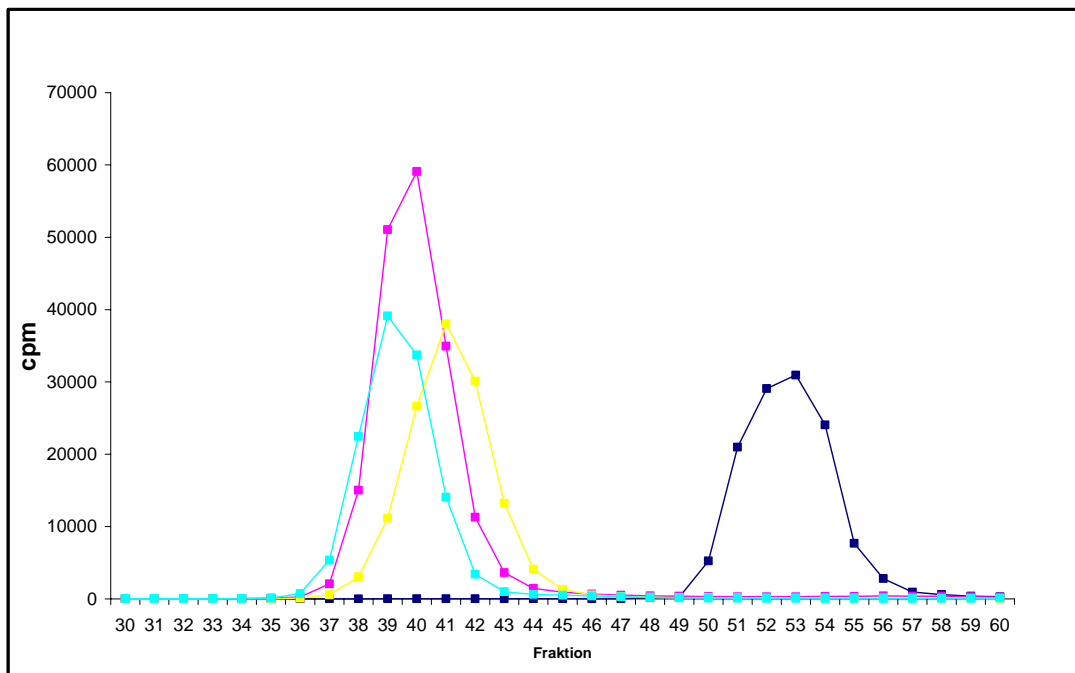


Abb.35: Pulse-Chase Experiment

■ Pulse, ■ Chase + 50 μM Zaprinast, ■ Chase + 50 μM Verapamil, ■ Chase

Für das *Pulse-Chase*-Experiment wurden B6-Zellen durch Hyaluronidase-Verdau von ihrer Hyaluronanhülle befreit und für den *Pulse* sofort in Gegenwart von [^3H]-Glukosamin inkubiert oder für den *Chase* zuerst 30 min mit nichtradioaktivem Medium ausgesetzt und dann in Gegenwart von [^3H]-Glukosamin und den Inhibitoren inkubiert. Nach anschließender Lyse der Zellen und Gelfiltration wurde die Menge an [^3H]-Hyaluronan szintillatorisch bestimmt.

Die Ergebnisse des *Pulse-Chase*-Experiments zeigen bei dem Chase in Gegenwart von 50 μM Verapamil eine Verringerung der Kettenlänge des intrazellulären Hyaluronans. Zaprinast führt in derselben Konzentration zu einer deutlichen Erhöhung des intrazellulären Hyaluronankonzentration, aber nicht zu einer Verlängerung der Kettenlänge.

6. Diskussion

Die Synthese von Hyaluronan erfolgt nicht wie die von anderen Glykosaminoglykanen im Golgi-Apparat, sondern an der inneren Seite der Plasmamembran (Pehm, 1984). Der genaue Weg des Hyaluronans durch die Plasmamembran in den Extrazellularraum blieb lange im Dunkeln. Das kontrovers diskutierte Modell, in dem die Synthese selbst für den Export verantwortlich ist (Pummil *et al.*, 2001), konnte nie bewiesen werden. Dies liegt auch daran, dass die Synthese Detergentien gegenüber sehr anfällig ist und somit bisher nicht im aktiven Zustand aus der Membran zu isolieren und in Membranvesikel rekonstituierbar war.

6.1 Einfluss von Hyaluronan-Oligosacchariden auf MRP5 und den endogenen Hyaluronan-Export

Einen ersten Hinweis auf MRP5 als Hyaluronan-Exporter gab die Inhibition des Transports von Fluorescein, einem MRP5-Substrat, durch mittels osmotische Lyse von makropinozytotischen Vesikeln ins Zytosol verbrachten Hyaluronan-Oligosacchariden. Hier könnte es zu einer kompetitiven Hemmung des Fluoresceinexports durch die Oligosaccharide gekommen sein.

Auch die Hemmung des endogenen Hyaluronan-Exportes durch diese Oligosaccharide wies in diese Richtung. Der endogene Export wurde nur durch das niedermolekulare Hyaluronan gehemmt, nicht aber durch hochmolekulares Hyaluronan oder die Monosaccharide. Dies deutet darauf hin, dass die Oligosaccharide den Eintritt der nichtreduzierenden Enden des endogenen Hyaluronans in den Kanal verhindern. Bei hochmolekularem Hyaluronan ist die Wahrscheinlichkeit viel geringer, dass das reduzierende Ende der Polysaccharidkette in den Kanal eingefädelt wird. Es liegen auch absolut weniger reduzierende Enden in der Zelle vor, was zu einer statistisch geringeren Chance führt, mit dem Kanal wechselzuwirken. Eine Reduktion des Exports aufgrund verminderter Zellvitalität ist eher unwahrscheinlich, da die Methode die Zellvitalität nicht beeinflusst (Rechsteiner, 1987) und kaum Zellschäden hervorruft (Ghosh & Iversen, 2000).

Aber auch hier konnte das Aktivieren von unbekannten Signaltransduktionskaskaden durch Hyaluronan-Oligosaccharide und eine damit einhergehende Transportinhibition nicht ausgeschlossen werden. Auch wird eine Induktion der induzierbaren NO-Synthase und damit

eine Erhöhung des cGMP-Spiegels durch Hyaluronan-Oligosaccharide diskutiert (Iacob & Knudson, 2005). Da diese bei Chondrozyten aber erst ab einer Konzentration von 250 µg/ml zu signifikanten Resultaten führt, und in diesem Fall aber nur 100 µg/ml eingesetzt wurden, ist dies eher unwahrscheinlich.

6.2 Identifizierung von MRP5 als Hyaluronan-Exporter mittels siRNA

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte erstmals unter Verwendung von siRNA die Analyse der Auswirkung des spezifischen *Knock-downs* von MRP5 auf den Hyaluronan-Export. Dazu wurden FVB-Mausfibroblasten verwendet, da sie MRP5 exprimieren und eine ausreichend große Menge an Hyaluronan sezernieren. Es konnte so erstmals gezeigt werden, dass MRP5, und nicht wie bisher vermutet die Synthase selbst für den Export von Hyaluronan in Fibroblasten verantwortlich ist. Von den drei verwendeten siRNAs war Nr.3 die wirksamste. Die Wirksamkeit ließ sich durch die Kombination mit Nr.1 und Nr.2 weiter erhöhen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass für eine wirksame Herabregulation eines Gens mehrere verschiedene siRNAs nötig sind (Caplen & Mousses, 2003). Die Kombination von Nr.1+3 führte zu einer fast vollständigen Reduktion der MRP5-Expression und ging mit einer Reduktion des Hyaluronan-Exportes auf 26,5% nach 48 Std. einher. Der Transport und die Synthese von Hyaluronan werden also in Fibroblasten von zwei unterschiedlichen Proteinen bewerkstelligt. Dies korreliert mit früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Prof. Prehm, die gezeigt haben, dass in Streptokokken der Export nicht durch die Synthase selbst vonstatten geht (Ouskova *et al.*, 2004). Das bisherige Modell, in dem die Synthase selbst für den Export verantwortlich ist (Pummil *et al.*, 2001), konnte so widerlegt werden. Der trotz der Reduktion der MRP5-Expression noch vorhandene Export lässt sich dadurch erklären, dass ein *knock-down* mittels siRNA meist nicht vollständig ist. Eine Kompensation des Verlustes durch andere Transporter insbesondere MRP4 und CFTR wurde im weiteren Verlauf der Arbeit mit Fibroblasten aus MRP5-defizienten Mäusen (de Wolf *et al.*, 2006) geklärt.

6.3 Identifizierung des Hyaluronan-Exporters in MRP5-defizienten Zellen

Hyaluronan-Synthase-defiziente Mäuse sterben an Tag 9.5 *in utero* (Camenisch *et al.*, 2000). Es kommt bei ihnen zu multiplen Defekten wie Missbildungen der Blutgefäße und Herzabnormitäten. Darüber hinaus ist Hyaluronan essentiell für die Mitose von Fibroblasten

(Brecht *et al.*, 1986). MRP5-defiziente FVB-Mäuse zeigen aber keinerlei Phänotyp (de Wolf *et al.*, 2007). Dies führte zu der Vermutung, dass es bei der Embryogenese zu einer Kompensation des Verlustes von MRP5 durch ein anderes Mitglied derselben Familie gekommen ist. Der Überprüfung der mRNA-Expression mittels RT-PCR von MDR1, MRP1-6, CFTR und MRP8 ergab nur eine Expression von MRP4 und MRP5 in den Wildtyp Fibroblasten und von MRP4, MRP5 und CFTR in den MRP5-defizienten Fibroblasten. Die Analyse der mRNA-Expression mittels *Real-Time*-PCR ergab eine vermehrte Expression von beiden Transportern. Da MRP4 auch in den Wildtyp Fibroblasten stark exprimiert wurde, CFTR aber nur sehr schwach, wurde dieser Transporter im weiteren Verlauf mit siRNA auf seine Funktion als alternativer Hyaluronan-Exporter hin untersucht. Hierbei konnte erstmalig gezeigt werden, dass CFTR, der klassische Chloridkanal, auch in der Lage ist, Hyaluronan zu transportieren. Eine Reduktion der CFTR-Expression durch die spezifische siRNA korrelierte mit einer Reduktion des Hyaluronan-Exportes. Die Exportrate konnte mit einer Kombination der siRNAs 2+3 nach 72 Std. um über 80% reduziert werden. Dieses Ergebnis war sehr überraschend und wirft ein völlig neues Licht auf die Pathobiochemie der Zystischen Fibrose, die häufigste humane Erbkrankheit. Eines der Hauptsymptome dieser Krankheit ist das Vorliegen von zähem Schleim in der Lunge und damit einhergehender Anfälligkeit für Infektionen, aber auch Leberschädigungen durch verstopfte Gallengänge oder Pancreasschäden durch Verschluss der Drüsen und damit einhergehend Autoproteolyse. Die Lebenserwartung der Patienten ist stark reduziert, sie lag 2002 bei nur 31,6 Jahren (Turcios, 2005).

Die alte Lehrmeinung, bei der das Krankheitsbild der Zystischen Fibrose auf einer Verfestigung des Mukus aufgrund des Verlusts des Chloridexports durch eine Mutation von CFTR beruht, wird mittlerweile angezweifelt. Der Verlust des Chloridexportes wird nicht mehr für die Verfestigung des Mukus verantwortlich gemacht. Auch das Auftreten von gleichen Salzkonzentrationen im „*airway surface liquid*“ (Bouder, 2007) spricht dagegen. Vielmehr wird eine Inaktivierung antibakterieller Peptide (Smith *et al.*, 1996), ein Vorhandensein bestimmter Oberflächenrezeptoren für Bakterien, die eine Infektion begünstigen (Imundo *et al.*, 1995), aber auch eine schon bei der Geburt proinflammatorische Lunge (Larson & Cohen, 2005), diskutiert. Dies alles erscheint durch die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Identifikation von CFTR als Hyaluronan-Exporter in völlig neuem Licht. Hyaluronan ist aufgrund seiner unter physiologischen Bedingungen vorliegenden hohen negativen Ladung stark hydratisiert und wäre so in der Lage die Hydratisierung des Mukus zu erhöhen und so die Viskosität zu erniedrigen. Somit könnte der Mukus besser durch die Zilien

abtransportiert werden. Auch das Verstopfen der Gallengänge und des Pankreas würde so verhindert werden können. Erste in unserer Arbeitsgruppe vorgenommene Bestimmungen des Hyaluronangehalts des Sputums von Zystische Fibrose Patienten und gesunden Probanden ergaben eine Reduktion des Hyaluronangehalts in den Patientenproben. Da aber bisher nur eine geringe Anzahl von Proben zur Verfügung standen, ist dies ein noch vorläufiges Ergebnis und muss in Zukunft validiert werden. Die Analyse von Patientenmaterial wird weiter verfolgt, ist aber durch Schwierigkeiten bei der Probenbeschaffung limitiert. Auch Versuche an Calu-3-Zellen, einer humanen Lungenadenocarcinomzelllinie haben gezeigt, dass diese nach Stimulation in der Lage sind über CFTR Hyaluronan zu exportieren. Diese immortalisierten, serösen Drüsenzellen produzieren Hyaluronan und exprimieren CFTR, aber nicht MRP5. Ein Transport von Hyaluronan via MRP4 aus diesen Zellen erscheint nicht wahrscheinlich, da dieser Transporter in MRP5-defizienten Mausfibroblasten stärker überexprimiert ist als CFTR, eine Reduktion der CFTR-Expression aber zu einem starken Rückgang des Exports führt. Wenn MRP4 am Transport beteiligt wäre, hätte dieser starke Effekt wesentlich schwächer ausfallen müssen. Auch zeigen MRP4/MRP5-defiziente Mäuse ebenso wie nur MRP5-defiziente keinen Phänotyp (de Wolf *et al.*, 2007).

6.4 Inhibition des Hyaluronan-Exportes

Nach der Identifizierung von MRP5 und CFTR als Hyaluronan-Exporter sollten Inhibitor-Studien Aufschluss über eine mögliche Regulation des Exports geben. Dazu wurden verschiedene Inhibitoren herangezogen, die zum Einen auch schon in vorangegangenen Versuchen ihre Wirksamkeit gezeigt hatten (Pehm & Schumacher, 2004), zum Anderen auf diesen Versuchen aufbauten. Auch sollten die Ergebnisse der siRNA-Versuche dadurch weiter untermauert werden.

6.4.1 Allgemeine Inhibitoren

Zuerst wurden allgemeine Inhibitoren verwandt. Verapamil und Benzbromaron zeigten eine gute Inhibition des Hyaluronan-Exportes. Wenn man jedoch den Einfluss auf die Syntheserate betrachtet, kommt man zu dem Schluss, dass die Inhibitionseffekte vor allem auf der Reduktion der Synthaseaktivität beruhen. Es lässt sich hier auch kein signifikanter

Unterschied zwischen den Wildtyp und den MRP5-defizienten Fibroblasten beobachten. Die Auswirkung auf MRP5 und CFTR sind also gleich (siehe Kapitel 5.7.1).

6.4.2 Phosphodiesterase-Hemmer

In den Vorversuchen mit humanen Fibroblasten und in einer parallel verlaufenden Promotion (Deiters, 2007) über Hyaluronan-Export aus Chondrozyten zeigte sich, dass Phosphodiesterase-(PDE)-Hemmer eine inhibitorische Wirkung auf den Hyaluronan-Export haben, gleichzeitig die Syntheserate aber nicht beeinflussen. In diesem Fall wurde Zaprinast, ein PDE5-Inhibitor genutzt, der in geringen Konzentrationen die PDE5 (IC_{50} : 0,6 μ M, Giordano *et al.*, 2001), in höheren Konzentrationen aber auch MRP5 (IC_{50} : 250 μ M, Reid *et al.*, 2003) hemmt. Hier zeigte sich eine Hemmung des Hyaluronan-Exportes von über 80% bei einer Konzentration von 100 μ M und von über 90% bei 200 μ M. Der Export kommt also bei einer Konzentration, die unterhalb des IC_{50} -Wertes bei MRP5 liegt, fast vollständig zum Erliegen. Dies deutet darauf hin, dass nicht die Hemmung des MRP5-Kanals, sondern die Hemmung der PDE5 und damit der Anstieg des intrazellulären cGMP-Spiegels für die inhibitorische Wirkung verantwortlich ist. Dafür spricht auch, dass cGMP ein Substrat von MRP5 ist und MRP5 als „Überdruckventil“ bei erhöhtem cGMP-Spiegel bekannt ist (Andric *et al.*, 2006). Im Folgenden wurde der nichtselektive PDE5 und PDE4-Inhibitor IBMX getestet. IBMX selber hat keine Wirkung auf die Hyaluronan-Synthase oder MRP5 (Jedlitschky *et al.*, 2000). Das physiologische Substrat von PDE4 ist cAMP. cGMP und cAMP akkumulieren also in der Zelle. Die Wirkung von IBMX auf die Wildtyp Fibroblasten ist wesentlich höher, als auf die MRP5-defizienten. Bei 50 μ M war die Exportrate bei den MRP5-defizienten Fibroblasten noch doppelt so hoch wie bei den Wildtyp Fibroblasten, aber bei 200 μ M war den Wildtyp Fibroblasten praktisch kein Transport mehr nachweisbar, wohingegen die MRP5-defizienten noch eine Exportrate von fast 40% aufwiesen. Die Affinität von MRP5 zu cGMP (K_M : 2 μ M) ist wesentlich höher als die zu cAMP (K_M : 400 μ M) (Jedlitschky *et al.*, 2000), aber das Vorhandensein von hohen Konzentrationen beider zyklischer Nukleotide führt anscheinend zu einer Verstärkung des Effekts. Auf CFTR scheint die Erhöhung der Konzentration der zyklischen Nukleotide einen wesentlich geringeren Einfluss zu haben. Der Export von Hyaluronan scheint hier anders geregelt zu sein.

6.4.3 Manipulation des cGMP-Spiegels

Da vieles auf eine Regulation des Hyaluronan-Exports via MRP5 über cGMP hindeutete, wurde nun der cGMP-Spiegel in den Wildtyp Fibroblasten manipuliert und die Auswirkungen auf den Export gemessen.

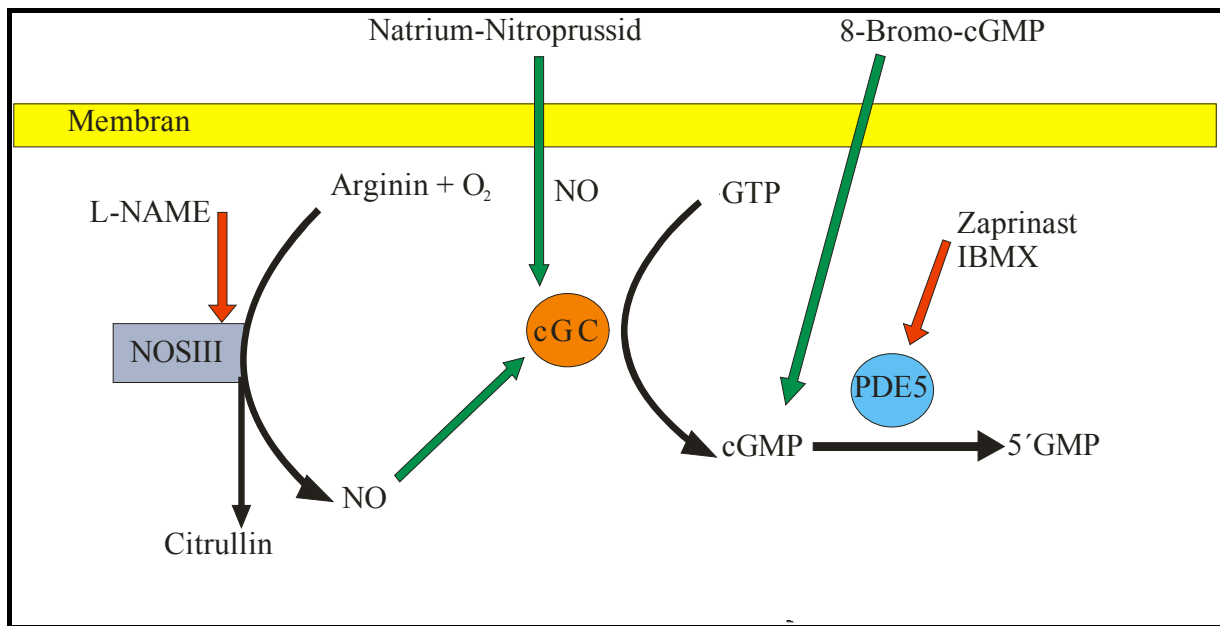


Abb.36: Beeinflussung des intrazellulären cGMP-Spiegels

NOS III: Stickstoffmonooxygenase III; **NO:** Stickstoffmonooxygenid; **cGC:** Guanylatzyklase; **PDE5:** Phosphodiesterase 5; **GTP:** Guanosintriphosphat; **cGMP:** Zyklisches Guanosintriphosphat; **5'GMP:** 5'-Guanosinmonophosphat; **L-NAME:** N^G-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester; **IBMX:** 3-Isobutyl-1-methylxanthin.

Zuerst wurde der intrazelluläre NO-Spiegel und damit der cGMP-Spiegel vermindert. Hierzu wurde der NO-Synthaseantagonist L-NAME eingesetzt. NO wird in den Zellen durch die NO-Synthasen (NOS) I-III aus Arginin zur Verfügung gestellt. L-NAME ist ein Argininanalogon und verhindert als kompetitiver Antagonist die Freisetzung von NO. Aufgrund des fehlenden NOs kann die Guanylatzyklase nicht aktiviert werden und dies führt zu einer Reduktion des intrazellulären cGMP-Spiegels. Die Hyaluronan-Synthase wird, wie auch MRP5, von L-NAME nicht beeinflusst. Der Export von Hyaluronan via MRP5 wurde nicht negativ beeinflusst. Es kam zu keiner Reduktion der Exportrate in den Wildtyp-Fibroblasten, selbst bei einer Konzentration die dem 15fachen des IC₅₀-Wertes von L-NAME für NOS III, der in Fibroblasten hauptsächlich exprimierten NO-Synthase, entsprach. Bei den MRP5-defizienten Fibroblasten kam es sogar zu einer leichten Erhöhung des Exports. Das Absenken des cGMP-Spiegels hat also keine negativen Auswirkungen auf den Hyaluronan-Export. Auch eine

Kombination von L-NAME und Verapamil änderte das Inhibitionsprofil von Verapamil nicht. Dies zeigt auch sehr deutlich, dass Verapamil den Export nicht über cGMP, sondern direkt über eine Verminderung der Syntheserate reduziert. Eine Kombination von L-NAME und Zaprinast hingegen führte zu einer deutlichen Verminderung des Effekts von Zaprinast in einem Konzentrationsbereich, in dem Zaprinast auf die PDE5 und noch nicht auf MRP5 selbst wirkt. Dies zeigt sehr deutlich, dass cGMP an der Regulation des Hyaluronan-Exportes beteiligt ist. Da eine Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels zu einer Verminderung des Exports führt, cGMP als Substrat für MRP5 bekannt ist (Jedlitschky *et al.*, 2000) und MRP5 als cGMP-Transporter bekannt (Andric *et al.*, 2006) ist, liegt der Schluss nahe, dass es sich um eine kompetitive Hemmung des Hyaluronan-Exportes in Wildtyp Fibroblasten durch cGMP handelt. Zur weiteren Abklärung des Einflusses von cGMP auf den Hyaluronan-Export wurde die endogene NO-Produktion durch L-NAME gehemmt und gleichzeitig durch Natrium-Nitroprussid, einem exogenen NO-Donor der intrazelluläre NO-Spiegel erhöht und die Guanylatzyklase aktiviert. Der Verlust von endogenem NO ließ sich hier durch exogenes substituieren und bei Konzentrationen ab 2,5 mM Natrium-Nitroprussid ließ sich der Effekt von L-NAME kompensieren. Diese hohen Konzentrationen lassen sich durch die geringe Halbwertszeit von NO in wässrigem Milieu ($t_{1/2} = 400\text{s}$ in H_2O , Hakim *et al.*, 1996) erklären. Der schnelle Abbau zu Nitrit und Nitrat macht eine hohe Konzentration des exogenen NO-Donors nötig, um eine Versorgung über einen längeren Zeitraum hinweg zu gewährleisten. Den direkten Beweis, dass cGMP den Hyaluronan-Export beeinflusst, wurde durch die Gabe eines exogenen cGMP-Analogons, 8-Bromoguanosin-3',5'-cyclomonophosphat (Bromo-cGMP) geliefert. Bromo-cGMP ist membrangängig und Hydrolyse- und Phosphodiesterasebeständig. Seine Konzentration wird also durch intrazelluläre Proteine nicht beeinflusst. Der Export kam nach der Gabe von 50 μM Bromo-cGMP in den Wildtyp Fibroblasten fast vollständig zum Erliegen. Dies zeigt sehr gut die kompetitive Hemmung des Hyaluronan-Exportes *via* MRP5 durch cGMP. Die physiologische Konzentration von cGMP im Zytosol liegt bei 1-2 μM , bei höheren Konzentrationen dient MRP5 als „Überlaufventil“ (Andrich *et al.*, 2006). Im Gegensatz dazu stieg er in den MRP5-defizienten Fibroblasten sogar noch um die Hälfte an. In den Wildtyp Fibroblasten kommt es zu einer kompetitiven Hemmung des Exportes. Da es bekannt ist, dass cGMP CFTR direkt aktivieren kann (Sullivan *et al.*, 1995), lässt sich so auch der Anstieg des Hyaluronan-Exportes aus den MRP5-defizienten Zellen erklären.

6.4.4 Manipulation des intrazellulären cAMP-Spiegels

Da MRP5 sowohl cGMP, als auch cAMP transportieren kann, wurde der intrazelluläre cAMP-Spiegel gezielt verändert. Die Affinität von cAMP ($K_M = 400 \mu\text{M}$) zu MRP5 ist allerdings wesentlich geringer als die von cGMP ($K_M = 2 \mu\text{M}$) (Jedlitschky *et al.*, 2000).

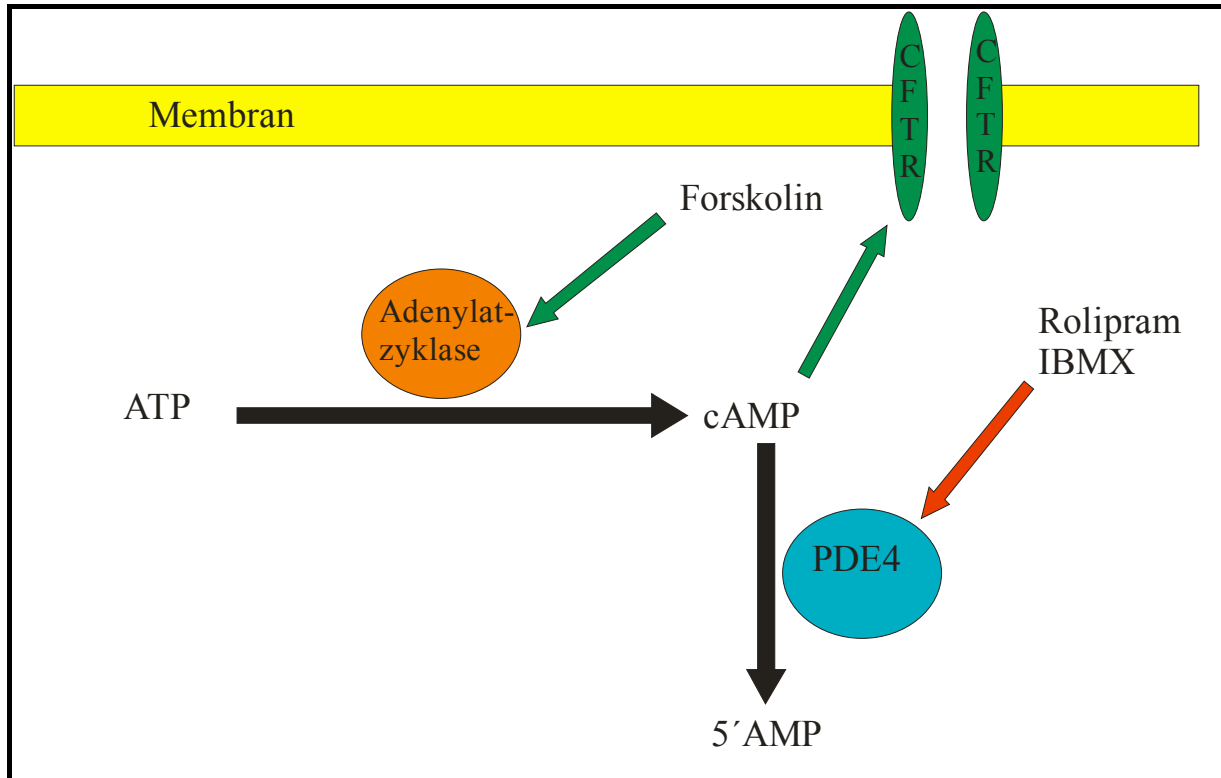


Abb.37: Beeinflussung des intrazellulären cAMP-Spiegels

PDE4: Phosphodiesterase 4; **ATP:** Adenosintriphosphat; **cAMP:** Zyklisches Adenosintriphosphat; **5'AMP:** 5'-Adenosinmonophosphat; **IBMX:** 3-Isobutyl-1-methylxanthin.

Es zeigte sich, dass die Erhöhung des cAMP-Spiegels durch Inhibition der cAMP-spezifischen PDE4 durch Rolipram bei den Wildtyp Fibroblasten zu einer Reduktion des Hyaluronan-Exportes führte. Diese Reduktion ist aber wesentlich geringer als bei einer Erhöhung des cGMP-Spiegels. Eine mit $25 \mu\text{M}$ mehr als 80x über dem IC_{50} -Wert (300 nM , Souness *et al.*, 1996) liegende Rolipramkonzentration hat bei den MRP5-defizienten Fibroblasten keine negative Auswirkung auf den Hyaluronan-Export. Er bewegte sich bei 100%.

Eine Erhöhung des cAMP-Spiegels durch Forskolin, einem Aktivator der Adenylatzyklase (EC_{50} : $4 \mu\text{M}$, Wei *et al.*, 2002), zeigte bei den Wildtyp Fibroblasten eine etwas stärkere Reduktion des Hyaluronan-Exportes als beim Einsatz von Rolipram. Aber auch hier kam es

bei weitem nicht zu einer vollständigen Reduktion. Bei 25 μM wurde immer noch eine Exportrate von 50% der unbehandelten Kontrolle erreicht. Bei den MRP5-defizienten Fibroblasten hatte Forskolin sogar eine leicht aktivierende Wirkung. Die lässt sich mit der Aktivierung von CFTR durch cAMP erklären (Pereira *et al.*, 2007).

Hohe cAMP-Konzentrationen können also den Hyaluronan-Export via MRP5 kompetitiv inhibieren, aber in weitaus geringerem Maß als hohe cGMP-Konzentrationen. cAMP hat, wie auch cGMP, anscheinend keine negativen Auswirkung auf den Hyaluronan-Export via CFTR.

6.4.5 Einfluss von CFTR-Inhibitoren auf den Hyaluronan-Export

Zur genaueren Untersuchung der Beteiligung von CFTR am Hyaluronan-Export wurden spezielle Chloridkanal-Inhibitoren genutzt. CFTR ist aufgrund seiner prominenten Rolle bei der Zystischen Fibrose gut untersucht und es sind verschiedene Agonisten und Antagonisten bekannt. 5-Nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoat (NPPB), ein unspezifischer Chloridkanal-Inhibitor, führt bei einer Konzentration von 50 μM zu einer vollständigen Inhibition der Chloridkanäle in verschiedenen Mausfibroblasten (Nilius *et al.*, 1994). Die Wildtyp Fibroblasten zeigten bei dieser Konzentration kaum einen Rückgang der Exportrate, bei den MRP5-defizienten hingegen kam der Export fast vollständig zum Erliegen. Dies zeigt die Beteiligung eines Chloridkanals am Hyaluronan-Export. Die Syntheserate wurde von NPPB kaum beeinflusst und liegt bei 50 μM knapp über 80%. Dies entspricht auch dem Export aus den Wildtyp Fibroblasten. Der Exportrückgang ist hier also nur auf die verminderte Synthese zurück zu führen.

Mit GlyH 101 wurde auch noch ein spezifischer CFTR-Inhibitor genutzt. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei den beiden Zelllinien. Bei den Wildtyp Fibroblasten zeigte sich nur eine sehr geringe Inhibition des Hyaluronan-Exportes. Bei 25 μM (IC_{50} -Wert: 4,3 μM , Muanprasat *et al.*, 2004) wurden noch mehr als 80% exportiert. Bei den MRP5-defizienten Fibroblasten war bei dieser Konzentration ein Rückgang des Exports um zwei Drittel zu beobachten. Da GlyH 101 an den extrazellulären Teil von CFTR bindet und nicht membrangängig ist, kann man auch einen Einfluss auf die intrazelluläre Hyaluronan-Synthase ausschließen. Auch diese Resultat zeigt die Beteiligung von CFTR am Hyaluronan-Export aus den MRP5-defizienten Fibroblasten. MRP4 scheint kaum am Hyaluronan-Export in diesen Zellen beteiligt zu sein, wenn auch immer ein geringer Transport nach der Hemmung von CFTR stattfindet. Trotz der viel stärkeren Expression von MRP4-mRNA in MRP5-defizienten Zellen ist dieser Transporter doch, wenn überhaupt nur in sehr geringem Maße am

Transport beteiligt. Dafür spricht auch das Vorhandensein von MRP5/MRP4-defizienten FVB-Mäusen, die über keinerlei Phänotyp verfügen (de Wolf *et al.*, 2007).

6.4.6 Pflanzliche Polyphenole

Auch die beiden pflanzlichen Polyphenole Quercetin, ein in vielen Pflanzen wie Tee (*Camellia sinensis*) oder Haushaltszwiebeln (*Allium cepa*) vorkommender Farbstoff, und Silibinin, ein Flavonoid aus Mariendistel (*Silybum marianum*), wurden auf ihre Auswirkung auf den Hyaluronan-Export hin untersucht. Beide Stoffe werden in der Pflanzenheilkunde traditionell zur Krebstherapie genutzt. Von Silibinin ist unter anderem die Wirksamkeit bei Hautkrebs (Singh & Agarwal, 2005) oder auch Prostatakrebs (Deep *et al.*, 2006) bekannt. Quercetin zeigte Wirksamkeit z.B. gegen Leukämie (Ma *et al.*, 2006) oder gegen Plattenepithelkarzinome (Haghiac & Walle, 2005). Von beiden ist darüber hinaus bekannt, dass sie MRP5 hemmen (IC₅₀-Wert: 25-50 µM; Wu *et al.*, 2005). Quercetin stimuliert darüber hinaus auch noch den Chlorid-Export via CFTR durch die cAMP-unabhängige Aktivierung von basolateralen Kalium-Kanälen (Cermak *et al.*, 2002).

Quercetin zeigte eine stärkere Wirkung auf die MRP5-defizienten Fibroblasten als auf die Wildtyp Fibroblasten. Dies kann mit der Aktivierung des cAMP-unabhängigen Chloridexports von CFTR erklärt werden. Hierbei scheint es sich um eine kompetitive Hemmung zu handeln. Eine cAMP-abhängige Aktivierung von CFTR, wie es etwa bei Forskolin der Fall ist, führt hingegen zu einer leichten Erhöhung der Exportrate. Silibinin, das vor allem auf MRP5 wirkt, führt bei den Wildtyp Fibroblasten zu einer signifikant stärkeren Inhibition als bei den MRP5-defizienten. Aber auch in den MRP5-defizienten hemmt es den Export in hohen Konzentrationen. Dies lässt sich mit den vielschichtigen Auswirkungen von Silibinin auf intrazelluläre Vorgänge erklären. Silibinin hat aber keinerlei Einfluss auf die Synthaserate. Auch die Ergebnisse der pflanzlichen Polyphenole beweisen dass MRP5 der Hyaluronan-Exporter in den Wildtyp Fibroblasten ist und CFTR der in den MRP5-defizienten.

6.4.7 Einfluss von Verapamil und Zaprinast auf den intrazellulären Hyaluronan-Spiegel

Es zeigte sich, dass Verapamil die intrazelluläre Hyaluronankonzentration mit steigenden Inhibitor-Konzentrationen verringert. Dies korreliert gut mit dem Absinken der Syntheserate durch Verapamil. Der Effekt des verminderten Exports lässt sich hier also zum einen auf eine Hemmung der Synthese zurückführen.

Im Gegensatz dazu steigt die intrazelluläre Hyaluronankonzentration in Gegenwart von Zaprinast an. Die extrazelluläre Konzentration nimmt aber ab. Dies zeigt, dass Zaprinast direkt und indirekt über die Erhöhung des cGMP-Spiegels wirkt. Zum selben Ergebnis kommt auch das *Pulse-Chase*-Experiment. Es gibt also zwei unterschiedliche Möglichkeiten der Hemmung des Exports. Zaprinast als cGMP-Analogon und cGMP direkt hemmen den Export kompetitiv, indem sie die Bindung der reduzierenden Enden des Hyaluronans an den Transporter verhindern. Ab einer gewissen intrazellulären Hyaluronankonzentration kommt es zu einer Produkthemmung der Synthese. Das neusynthetisierte hochmolekulare Hyaluronan übt eine Rückkopplungshemmung auf die weitere Kettenverlängerung aus (Lüke & Prehm, 1999). Dies ist sinnvoll, da Hyaluronan aufgrund seiner Hydratation einen starken osmotischen Druck in der Zelle erzeugt. Käme es nicht zu einer Produkthemmung, würde die Zelle aufgrund des einströmenden Wassers platzen.

Die Hemmung des Exports durch Verapamil hingegen ist nicht kompetitiv, hier kommt es zu einer Verminderung des Syntheserates.

6.5 Modell der Regulation des Hyaluronan-Exportes bei Wildtyp Fibroblasten

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals MRP5 als der Hyaluronan-Exporter in Mausfibroblasten identifiziert werden. Dabei konnte die Regulierung des Hyaluronan-Exports durch cGMP in Wildtyp Fibroblasten gezeigt werden. Dies korreliert gut mit den Beobachtungen, dass im postischämischen Herzen die NO-Produktion und der cGMP-Spiegel erniedrigt sind (Itho *et al.*, 2006) und es gleichzeitig zu einem erhöhten Hyaluronan-Export im Myocard kommt (Waldenstrom *et al.*, 1991). Darüberhinaus kommt es bei Lungenödemen zu einem Anstieg der Hyaluronankonzentration in den Lungen (Quinn & Garg, 2006) und posttransplantäre Lungenödeme lassen sich durch die Gabe von Bromo-cGMP behandeln (Sander *et al.*, 2000).

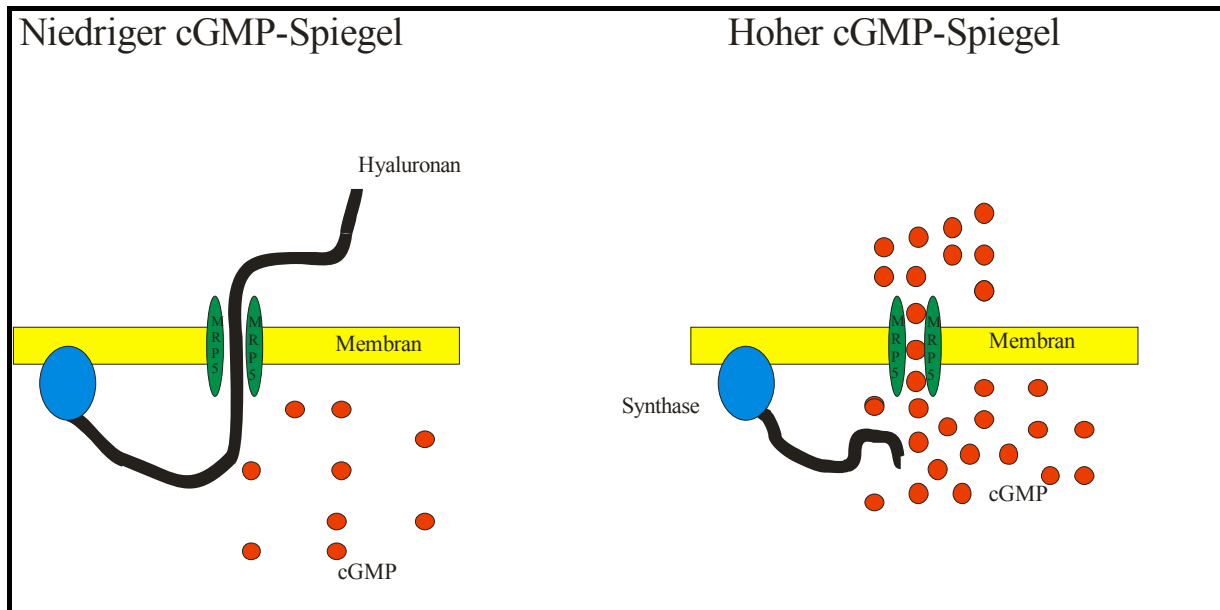


Abb.38: Regulation des Hyaluronan-Exportes aus Fibroblasten mittels cGMP

Zusammenfassend ergibt sich folgendes Modell der Regulation des Hyaluronan-Exportes in Fibroblasten:

Bei niedrigem cGMP-Spiegel in der Zelle kann das Hyaluronan durch MRP5 die Zellmembran passieren und in den Extrazellarraum gelangen. Bei einem hohen cGMP-Spiegel hingegen kommt es zu einer kompetitiven Hemmung und das Hyaluronan kann die Zellmembran nicht mehr passieren.

6.6 Modell zur Beteiligung von Hyaluronan am Krankheitsbild der Zystischen Fibrose

Der im Rahmen dieser Arbeit erstmals erfolgte Nachweis, dass CFTR Hyaluronan exportieren kann, wirft ein völlig neues Licht auf die Ätiologie der Zystischen Fibrose. Auch hier ergibt sich ein neues Modell der Hydratation des Mukus.

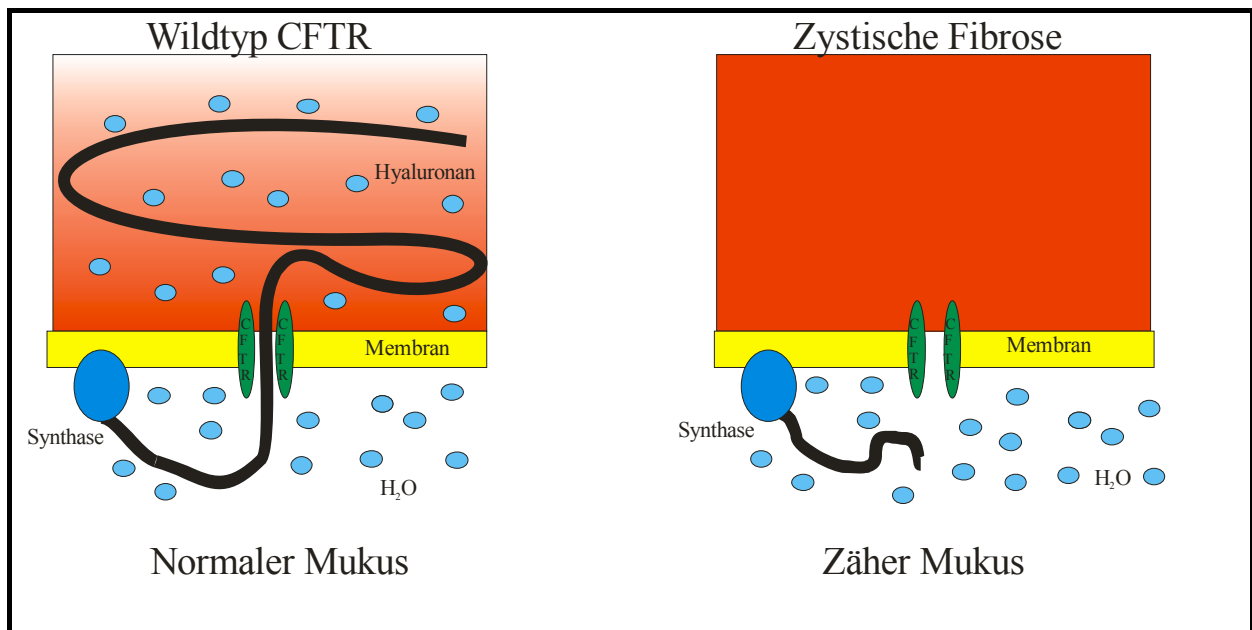


Abb.39: Einfluss von Hyaluronan auf die Hydratation des Mukus

In unserem Modell der Zystischen Fibrose kommt es durch den Mangel an Hyaluronan und der damit einhergehenden schlechteren Hydratation zur Verfestigung des Mukus. Dies steht in Kontrast zu den bisherigen Modellen, in denen der fehlende Chlorid-Export durch den nichtfunktionellen CFTR-Kanal für zähen Mucus und damit das Krankheitsbild der Zystischen Fibrose verantwortlich gemacht wird. Aber das Auftreten von gleichen, isotonischen Salzkonzentrationen im „airway surface liquid“ von CFTR-Patienten und Vergleichspersonen (Boucher, 2007) spricht dagegen, dass Chlorid für die Hydratation des Mukus verantwortlich ist. Allerdings wird auch ein Modell diskutiert, dass eine zu hohe Salzkonzentration im Mucus und eine dadurch verminderte Aktivität antimikrobieller Peptide als Auslöser der Symptome sieht (Smith *et al.*, 1996). Es gibt also verschiedene, z.T. gegenläufige Modelle, die aber alle keine befriedigende Erklärung bieten. Die Beteiligung von Hyaluronan an der Hydratation hilft aber das Paradoxon der gleichen Salzkonzentration und trotzdem unterschiedlich Viskosität des Mukus zu erklären.

6.7 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals die zwei MRP-Transporter (MRP5 und CFTR) als Hyaluronan-Exporter in Mausfibroblasten identifiziert werden und die kompetitive Hemmung des Hyaluronan-Exportes *via* MRP5 durch cGMP belegt werden. Zur Identifizierung möglicher weiterer Transporter wäre es interessant, MRP5/CFTR-defiziente Mäuse herzustellen und dort die Expression der unterschiedlichen Transporter zu überprüfen. Die Generierung dieser Mäuse wird zurzeit von Prof. Udo Schumacher (Universitätsklinik Eppendorf, Hamburg) verfolgt, wird aber durch die schlechte Vitalität der CFTR-Mäuse limitiert.

Aber besonders die Tatsache, dass Hyaluronan für die Hydratation des Mukus verantwortlich sein kann, sollte Gegenstand weiterer Studien sein. Möglicherweise könnten Hyaluronan-Synthase-Aktivatoren die Symptome der Zystischen Fibrose entscheidend lindern. Da aber fünf Hauptzelltypen (zilientragende Zellen, basale Zellen, Becherzellen, nichtzilien-tragende Zylinderzellen und intermediäre Zellen (Jiang & Engelhardt, 1997)) in den Atemwegen lokalisiert sind und diese differierende Expressionsmuster der unterschiedliche MRP-Transporter aufweisen, bietet sich hier ein weites Feld für folgende Untersuchungen. Auch die Analyse des Hyaluronangehalts des Mukus bei CFTR-Patienten muss trotz der äußerst limitierten Möglichkeiten der Probenbeschaffung weiter verfolgt werden. Alternativ könnten hierfür auch verschiedenen CFTR-Mausmodelle herangezogen werden.

7.Literatur

- Agren, U. M.; Tammi, R. H.; Tammi, M. I. Reactive oxygen species contribute to epidermal hyaluronan catabolism in human skin organ culture. *Free Radic. Biol. Med.* **1997**, 23 (7), 996-1001.
- Ambudkar, S. V.; Kimchi-Sarfaty, C.; Sauna, Z. E.; Gottesman, M. M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* **2003**, 22 (47), 7468-7485.
- Andric, S. A.; Kostic, T. S.; Stojilkovic, S. S. Contribution of multidrug resistance protein MRP5 in control of cyclic guanosine 5'-monophosphate intracellular signaling in anterior pituitary cells. *Endocrinology* **2006**, 147 (7), 3435-3445.
- Auvinen, P.; Tammi, R.; Parkkinen, J.; Tammi, M.; Agren, U.; Johansson, R.; Hirvikoski, P.; Eskelinen, M.; Kosma, V. M. Hyaluronan in peritumoral stroma and malignant cells associates with breast cancer spreading and predicts survival. *Am. J. Pathol.* **2000**, 156 (2), 529-536.
- Baraniuk, J. N.; Shizari, T.; Sabol, M.; Ali, M.; Underhill, C. B. Hyaluronan is exocytosed from serous, but not mucous cells, of human nasal and tracheobronchial submucosal glands. *J. Investig. Med.* **1996**, 44 (2), 47-52.
- Beavo, J. A.; Brunton, L. L. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, 3 (9), 710-718.
- Belinsky, M. G.; Bain, L. J.; Balsara, B. B.; Testa, J. R.; Kruh, G. D. Characterization of MOAT-C and MOAT-D, new members of the MRP/cMOAT subfamily of transporter proteins. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998**, 90 (22), 1735-1741.
- Bertrand, C. A.; Frizzell, R. A. The role of regulated CFTR trafficking in epithelial secretion. *Am. J. Physiol Cell Physiol* **2003**, 285 (1), C1-18.
- Bodevin-Authelet, S.; Kusche-Gullberg, M.; Pummill, P. E.; DeAngelis, P. L.; Lindahl, U. Biosynthesis of hyaluronan: direction of chain elongation. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280 (10), 8813-8818.
- Boucher, R. C. Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in CF airway disease. *J. Intern. Med.* **2007**, 261 (1), 5-16.
- Bourguignon, L. Y.; Zhu, D.; Zhu, H. CD44 isoform-cytoskeleton interaction in oncogenic signaling and tumor progression. *Front Biosci.* **1998**, 3, d637-d649.
- Brecht, M.; Mayer, U.; Schlosser, E.; Prehm, P. Increased hyaluronate synthesis is required for fibroblast detachment and mitosis. *Biochem. J.* **1986**, 239 (2), 445-450.
- Brennan, A. L.; Geddes, D. M. Cystic fibrosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2002**, 15 (2), 175-182.
- Burnette, W. N. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal. Biochem.* **1981**, 112 (2), 195-203.

Camenisch, T. D.; Spicer, A. P.; Brehm-Gibson, T.; Biesterfeldt, J.; Augustine, M. L.; Calabro, A., Jr.; Kubalak, S.; Klewer, S. E.; McDonald, J. A. Disruption of hyaluronan synthase-2 abrogates normal cardiac morphogenesis and hyaluronan-mediated transformation of epithelium to mesenchyme. *J. Clin. Invest* **2000**, *106* (3), 349-360.

Camenisch, T. D.; McDonald, J. A. Hyaluronan: is bigger better? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2000**, *23* (4), 431-433.

Caplen, N. J.; Mousses, S. Short interfering RNA (siRNA)-mediated RNA interference (RNAi) in human cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2003**, *1002*, 56-62.

Cary, S. P.; Winger, J. A.; Derbyshire, E. R.; Marletta, M. A. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. *Trends Biochem. Sci.* **2006**, *31* (4), 231-239.

Cermak, R.; Kuhn, G.; Wolfram, S. The flavonol quercetin activates basolateral K(+) channels in rat distal colon epithelium. *Br. J. Pharmacol.* **2002**, *135* (5), 1183-1190.

Chen, C.; Slitt, A. L.; Dieter, M. Z.; Tanaka, Y.; Scheffer, G. L.; Klaassen, C. D. Up-regulation of Mrp4 expression in kidney of Mrp2-deficient TR- rats. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70* (7), 1088-1095.

Chen, Z. S.; Lee, K.; Kruh, G. D. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276* (36), 33747-33754.

Collins, F. S. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* **1992**, *256* (5058), 774-779.

Comper, W. D.; Laurent, T. C. Physiological function of connective tissue polysaccharides. *Physiol Rev.* **1978**, *58* (1), 255-315.

D.A.Quinn and H.G.Garg Hyaluronan in Acute Lung Injury. In *Yearbook of intensive care and emergency medicine*, Springer Berlin Heidelberg: 2006; pp 349-358.

Dalton, W. S.; Grogan, T. M.; Meltzer, P. S.; Scheper, R. J.; Durie, B. G.; Taylor, C. W.; Miller, T. P.; Salmon, S. E. Drug-resistance in multiple myeloma and non-Hodgkin's lymphoma: detection of P-glycoprotein and potential circumvention by addition of verapamil to chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* **1989**, *7* (4), 415-424.

Dawson, D. C.; Smith, S. S.; Mansoura, M. K. CFTR: mechanism of anion conduction. *Physiol Rev.* **1999**, *79* (1 Suppl), S47-S75.

Day, A. J.; Prestwich, G. D. Hyaluronan-binding proteins: tying up the giant. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (7), 4585-4588.

de Wolf, C. J.; Yamaguchi, H.; van der Heijden, I.; Wielinga, P. R.; Hundscheid, S. L.; Ono, N.; Scheffer, G. L.; de Haas, M.; Schuetz, J. D.; Wijnholds, J.; Borst, P. cGMP transport by vesicles from human and mouse erythrocytes. *FEBS J.* **2007**, *274* (2), 439-450.

Dean, M.; Hamon, Y.; Chimini, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *J. Lipid Res.* **2001**, *42* (7), 1007-1017.

- Deep, G.; Singh, R. P.; Agarwal, C.; Kroll, D. J.; Agarwal, R. Silymarin and silibinin cause G1 and G2-M cell cycle arrest via distinct circuitries in human prostate cancer PC3 cells: a comparison of flavanone silibinin with flavanolignan mixture silymarin. *Oncogene* **2006**, *25* (7), 1053-1069.
- Deiters, B. Untersuchungen zum Hyaluronan Export aus Chondrozyten bei arthrotischen Veränderungen. Dec 2006.
- Delpech, B.; Maingonnat, C.; Girard, N.; Chauzy, C.; Maunoury, R.; Olivier, A.; Tayot, J.; Creissard, P. Hyaluronan and hyaluronectin in the extracellular matrix of human brain tumour stroma. *Eur. J. Cancer* **1993**, *29A* (7), 1012-1017.
- Denk, G. U.; Soroka, C. J.; Takeyama, Y.; Chen, W. S.; Schuetz, J. D.; Boyer, J. L. Multidrug resistance-associated protein 4 is up-regulated in liver but down-regulated in kidney in obstructive cholestasis in the rat. *J. Hepatol.* **2004**, *40* (4), 585-591.
- Egan, M. E.; Pearson, M.; Weiner, S. A.; Rajendran, V.; Rubin, D.; Glockner-Pagel, J.; Canny, S.; Du, K.; Lukacs, G. L.; Caplan, M. J. Curcumin, a major constituent of turmeric, corrects cystic fibrosis defects. *Science* **2004**, *304* (5670), 600-602.
- Elbashir, S. M.; Harborth, J.; Lendeckel, W.; Yalcin, A.; Weber, K.; Tuschl, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **2001**, *411* (6836), 494-498.
- Evanko, S. P.; Wight, T. N. Intracellular localization of hyaluronan in proliferating cells. *J. Histochem. Cytochem.* **1999**, *47* (10), 1331-1342.
- Fogh, J.; Wright, W. C.; Loveless, J. D. Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J. Natl. Cancer Inst.* **1977**, *58* (2), 209-214.
- Fraser, J. R.; Laurent, T. C.; Laurent, U. B. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J. Intern. Med.* **1997**, *242* (1), 27-33.
- Ghosh, C.; Iversen, P. L. Intracellular delivery strategies for antisense phosphorodiamidate morpholino oligomers. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* **2000**, *10* (4), 263-274.
- Giordano, D.; De Stefano, M. E.; Citro, G.; Modica, A.; Giorgi, M. Expression of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an antibody against the enzyme amino-terminal domain. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1539* (1-2), 16-27.
- Goa, K. L.; Benfield, P. Hyaluronic acid. A review of its pharmacology and use as a surgical aid in ophthalmology, and its therapeutic potential in joint disease and wound healing. *Drugs* **1994**, *47* (3), 536-566.
- Goodison, S.; Urquidi, V.; Tarin, D. CD44 cell adhesion molecules. *Mol. Pathol.* **1999**, *52* (4), 189-196.
- Graham, F. L.; Smiley, J.; Russell, W. C.; Nairn, R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* **1977**, *36* (1), 59-74.
- Gray, M. A.; Plant, S.; Argent, B. E. cAMP-regulated whole cell chloride currents in pancreatic duct cells. *Am. J. Physiol* **1993**, *264* (3 Pt 1), C591-C602.

- Greger, R.; Schreiber, R.; Mall, M.; Wissner, A.; Hopf, A.; Briel, M.; Bleich, M.; Warth, R.; Kunzelmann, K. Cystic fibrosis and CFTR. *Pflugers Arch.* **2001**, *443 Suppl 1*, S3-S7.
- Guilbault, C.; Saeed, Z.; Downey, G. P.; Radzioch, D. Cystic fibrosis mouse models. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2007**, *36* (1), 1-7.
- Haghiac, M.; Walle, T. Quercetin induces necrosis and apoptosis in SCC-9 oral cancer cells. *Nutr. Cancer* **2005**, *53* (2), 220-231.
- Hakim, T. S.; Sugimori, K.; Camporesi, E. M.; Anderson, G. Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin. *Physiol Meas.* **1996**, *17* (4), 267-277.
- Haws, C.; Finkbeiner, W. E.; Widdicombe, J. H.; Wine, J. J. CFTR in Calu-3 human airway cells: channel properties and role in cAMP-activated Cl⁻ conductance. *Am. J. Physiol* **1994**, *266* (5 Pt 1), L502-L512.
- Hyde, S. C.; Emsley, P.; Hartshorn, M. J.; Mimmack, M. M.; Gileadi, U.; Pearce, S. R.; Gallagher, M. P.; Gill, D. R.; Hubbard, R. E.; Higgins, C. F. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* **1990**, *346* (6282), 362-365.
- Jacob, S.; Knudson, C. B. Hyaluronan fragments activate nitric oxide synthase and the production of nitric oxide by articular chondrocytes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38* (1), 123-133.
- Itano, N.; Sawai, T.; Miyaishi, O.; Kimata, K. Relationship between hyaluronan production and metastatic potential of mouse mammary carcinoma cells. *Cancer Res.* **1999**, *59* (10), 2499-2504.
- Itoh, T.; Haruna, M.; Abe, K. Differential regulation of the nitric oxide-cGMP pathway exacerbates postischaemic heart injury in stroke-prone hypertensive rats. *Exp. Physiol* **2007**, *92* (1), 147-159.
- Jedlitschky, G.; Burchell, B.; Keppler, D. The multidrug resistance protein 5 functions as an ATP-dependent export pump for cyclic nucleotides. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275* (39), 30069-30074.
- Jiang, Q.; Engelhardt, J. F. Cellular heterogeneity of CFTR expression and function in the lung: implications for gene therapy of cystic fibrosis. *Eur. J. Hum. Genet.* **1998**, *6* (1), 12-31.
- Juhlin, L. Hyaluronan in skin. *J. Intern. Med.* **1997**, *242* (1), 61-66.
- Kendall, F. E.; Heidelberger, M.; Dawson, M. H. A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic streptococci. *J. Biol. Chemistry* **1937**, *118*, 61-69.
- Khan, T. Z.; Wagener, J. S.; Bost, T.; Martinez, J.; Accurso, F. J.; Riches, D. W. Early pulmonary inflammation in infants with cystic fibrosis. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* **1995**, *151* (4), 1075-1082.
- Klempner, M. S.; Mikkelsen, R. B.; Corfman, D. H.; Andre-Schwartz, J. Neutrophil plasma membranes. I. High-yield purification of human neutrophil plasma membrane vesicles by nitrogen cavitation and differential centrifugation. *J. Cell Biol.* **1980**, *86* (1), 21-28.

Koyama, H.; Yatabe, I.; Ono, T. Isolation and characterization of hybrids between mouse and Chinese hamster cell lines. *Exp. Cell Res.* **1970**, *62* (2), 455-463.

Kruh, G. D.; Belinsky, M. G. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene* **2003**, *22* (47), 7537-7552.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **1970**, *227* (5259), 680-685.

Larson, J. E.; Cohen, J. C. Developmental paradigm for early features of cystic fibrosis. *Pediatr. Pulmonol.* **2005**, *40* (5), 371-377.

Laurent, T. C.; Fraser, J. R. Hyaluronan. *FASEB J.* **1992**, *6* (7), 2397-2404.

Lesley, J.; Hyman, R.; English, N.; Catterall, J. B.; Turner, G. A. CD44 in inflammation and metastasis. *Glycoconj. J.* **1997**, *14* (5), 611-622.

Lokeshwar, V. B.; Obek, C.; Pham, H. T.; Wei, D.; Young, M. J.; Duncan, R. C.; Soloway, M. S.; Block, N. L. Urinary hyaluronic acid and hyaluronidase: markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. *J. Urol.* **2000**, *163* (1), 348-356.

Longaker, M. T.; Adzick, N. S.; Hall, J. L.; Stair, S. E.; Crombleholme, T. M.; Duncan, B. W.; Bradley, S. M.; Harrison, M. R.; Stern, R. Studies in fetal wound healing, VII. Fetal wound healing may be modulated by hyaluronic acid stimulating activity in amniotic fluid. *J. Pediatr. Surg.* **1990**, *25* (4), 430-433.

Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193* (1), 265-275.

Lucas, K. A.; Pitari, G. M.; Kazerounian, S.; Ruiz-Stewart, I.; Park, J.; Schulz, S.; Chepenik, K. P.; Waldman, S. A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.* **2000**, *52* (3), 375-414.

Luke, H. J.; Prehm, P. Synthesis and shedding of hyaluronan from plasma membranes of human fibroblasts and metastatic and non-metastatic melanoma cells. *Biochem. J.* **1999**, *343 Pt 1*, 71-75.

Ma, L.; Feugang, J. M.; Konarski, P.; Wang, J.; Lu, J.; Fu, S.; Ma, B.; Tian, B.; Zou, C.; Wang, Z. Growth inhibitory effects of quercetin on bladder cancer cell. *Front Biosci.* **2006**, *11*, 2275-2285.

MacGregor, D. A.; Prielipp, R. C.; Butterworth, J. F.; James, R. L.; Royster, R. L. Relative efficacy and potency of beta-adrenoceptor agonists for generating cAMP in human lymphocytes. *Chest* **1996**, *109* (1), 194-200.

McAleer, M. A.; Breen, M. A.; White, N. L.; Matthews, N. pABC11 (also known as MOAT-C and MRP5), a member of the ABC family of proteins, has anion transporter activity but does not confer multidrug resistance when overexpressed in human embryonic kidney 293 cells. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274* (33), 23541-23548.

Mergey, M.; Lemnaouar, M.; Veissiere, D.; Perricaudet, M.; Gruenert, D. C.; Picard, J.; Capeau, J.; Brahimi-Horn, M. C.; Paul, A. CFTR gene transfer corrects defective

glycoconjugate secretion in human CF epithelial tracheal cells. *Am. J. Physiol* **1995**, 269 (6 Pt 1), L855-L864.

Meyer, K.; Palmer, J. W. The polysaccharide of the vitreous humor. *J. Biol. Chemistry* **1934**, 107, 629-634.

Meyer, K. The biological significance of hyaluronic acid and hyaluronidase. *Physiol. Rev.* **1947**, 27, 335-359.

Miller, T. P.; Grogan, T. M.; Dalton, W. S.; Spier, C. M.; Scheper, R. J.; Salmon, S. E. P-glycoprotein expression in malignant lymphoma and reversal of clinical drug resistance with chemotherapy plus high-dose verapamil. *J. Clin. Oncol.* **1991**, 9 (1), 17-24.

Mitchell, J. A.; Kohlhaas, K. L.; Sorrentino, R.; Warner, T. D.; Murad, F.; Vane, J. R. Induction by endotoxin of nitric oxide synthase in the rat mesentery: lack of effect on action of vasoconstrictors. *Br. J. Pharmacol.* **1993**, 109 (1), 265-270.

Morales, T. I.; Hascall, V. C. Correlated metabolism of proteoglycans and hyaluronic acid in bovine cartilage organ cultures. *J. Biol. Chem.* **1988**, 263 (8), 3632-3638.

Muanprasat, C.; Sonawane, N. D.; Salinas, D.; Taddei, A.; Galiotta, L. J.; Verkman, A. S. Discovery of glycine hydrazide pore-occluding CFTR inhibitors: mechanism, structure-activity analysis, and in vivo efficacy. *J. Gen. Physiol* **2004**, 124 (2), 125-137.

Nilius, B.; Sehrer, J.; Viana, F.; de Greef, C.; Raeymaekers, L.; Eggermont, J.; Droogmans, G. Volume-activated Cl⁻ currents in different mammalian non-excitabile cell types. *Pflugers Arch.* **1994**, 428 (3-4), 364-371.

Ouskova, G.; Spellerberg, B.; Prehm, P. Hyaluronan release from *Streptococcus pyogenes*: export by an ABC transporter. *Glycobiology* **2004**, 14 (10), 931-938.

Pereira, M. M.; Parker, J.; Stratford, F. L.; McPherson, M.; Dormer, R. L. Activation mechanisms for the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein involve direct binding of cyclic AMP. *Biochem. J.* **2007**.

Peterson, R. M.; Yu, Q.; Stamenkovic, I.; Toole, B. P. Perturbation of hyaluronan interactions by soluble CD44 inhibits growth of murine mammary carcinoma cells in ascites. *Am. J. Pathol.* **2000**, 156 (6), 2159-2167.

Prehm, P. Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Characterization of the synthase. *Biochem. J.* **1983**, 211 (1), 181-189.

Prehm, P. Synthesis of hyaluronate in differentiated teratocarcinoma cells. Mechanism of chain growth. *Biochem. J.* **1983**, 211 (1), 191-198.

Prehm, P. Hyaluronate is synthesized at plasma membranes. *Biochem. J.* **1984**, 220 (2), 597-600.

Prehm, P.; Schumacher, U. Inhibition of hyaluronan export from human fibroblasts by inhibitors of multidrug resistance transporters. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, 68 (7), 1401-1410.

Prehm, P. Biosynthesis of hyaluronan: direction of chain elongation. *Biochem. J.* **2006**, 398 (3), 469-473.

- Prevo, R.; Banerji, S.; Ferguson, D. J.; Clasper, S.; Jackson, D. G. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (22), 19420-19430.
- Pummill, P. E.; Kempner, E. S.; DeAngelis, P. L. Functional molecular mass of a vertebrate hyaluronan synthase as determined by radiation inactivation analysis. *J. Biol. Chem.* **2001**, 276 (43), 39832-39835.
- Rechsteiner, M. Osmotic lysis of pinosomes. *Methods Enzymol.* **1987**, 149, 42-48.
- Reid, G.; Wielinga, P.; Zelcer, N.; de Haas M.; van Deemter, L.; Wijnholds, J.; Balzarini, J.; Borst, P. Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol. Pharmacol.* **2003**, 63 (5), 1094-1103.
- Roden, L.; Campbell, P.; Fraser, J. R.; Laurent, T. C.; Pertoft, H.; Thompson, J. N. Enzymic pathways of hyaluronan catabolism. *Ciba Found. Symp.* **1989**, 143, 60-76.
- Ropponen, K.; Tammi, M.; Parkkinen, J.; Eskelinen, M.; Tammi, R.; Lipponen, P.; Agren, U.; Alhava, E.; Kosma, V. M. Tumor cell-associated hyaluronan as an unfavorable prognostic factor in colorectal cancer. *Cancer Res.* **1998**, 58 (2), 342-347.
- Rosen, R. C.; Kostis, J. B. Overview of phosphodiesterase 5 inhibition in erectile dysfunction. *Am. J. Cardiol.* **2003**, 92 (9A), 9M-18M.
- Sager, G.; Orbo, A.; Pettersen, R. H.; Kjorstad, K. E. Export of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) from human erythrocytes characterized by inside-out membrane vesicles. *Scand. J. Clin. Lab Invest* **1996**, 56 (4), 289-293.
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **1988**, 239 (4839), 487-491.
- Sandera, P.; Hillinger, S.; Stammberger, U.; Schoedon, G.; Zalunardo, M.; Weder, W.; Schmid, R. A. 8-Br-cyclic GMP given during reperfusion improves post-transplant lung edema and free radical injury. *J. Heart Lung Transplant.* **2000**, 19 (2), 173-178.
- Schinkel, A. H.; Jonker, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2003**, 55 (1), 3-29.
- Setälä, L. P.; Tammi, M. I.; Tammi, R. H.; Eskelinen, M. J.; Lipponen, P. K.; Agren, U. M.; Parkkinen, J.; Alhava, E. M.; Kosma, V. M. Hyaluronan expression in gastric cancer cells is associated with local and nodal spread and reduced survival rate. *Br. J. Cancer* **1999**, 79 (7-8), 1133-1138.
- Singh, R. P.; Agarwal, R. Mechanisms and preclinical efficacy of silibinin in preventing skin cancer. *Eur. J. Cancer* **2005**, 41 (13), 1969-1979.
- Smith, J. J.; Travis, S. M.; Greenberg, E. P.; Welsh, M. J. Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* **1996**, 85 (2), 229-236.

- Souness, J. E.; Griffin, M.; Maslen, C.; Ebsworth, K.; Scott, L. C.; Pollock, K.; Palfreyman, M. N.; Karlsson, J. A. Evidence that cyclic AMP phosphodiesterase inhibitors suppress TNF alpha generation from human monocytes by interacting with a 'low-affinity' phosphodiesterase 4 conformer. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *118* (3), 649-658.
- Stern, M.; Stern, R. An ELISA-like assay for hyaluronidase and hyaluronidase inhibitors. *Matrix* **1992**, *12* (5), 397-403.
- Stone, J. R.; Marletta, M. A. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry* **1994**, *33* (18), 5636-5640.
- Sullivan, S. K.; Agellon, L. B.; Schick, R. Identification and partial characterization of a domain in CFTR that may bind cyclic nucleotides directly. *Curr. Biol.* **1995**, *5* (10), 1159-1167.
- Sundblad, L. The chemistry of synovial fluid with special regard to hyaluronic acid. *Acta Orthop. Scand.* **1950**, *20* (2), 105-113.
- Takemura, H.; Hughes, A. R.; Thastrup, O.; Putney, J. W., Jr. Activation of calcium entry by the tumor promoter thapsigargin in parotid acinar cells. Evidence that an intracellular calcium pool and not an inositol phosphate regulates calcium fluxes at the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264* (21), 12266-12271.
- Tammi, M. I.; Day, A. J.; Turley, E. A. Hyaluronan and homeostasis: a balancing act. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277* (7), 4581-4584.
- Tlapak-Simmons, V. L.; Kempner, E. S.; Baggenstoss, B. A.; Weigel, P. H. The active streptococcal hyaluronan synthases (HASs) contain a single HAS monomer and multiple cardiolipin molecules. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273* (40), 26100-26109.
- Toole, B. P. Hyaluronan in morphogenesis. *J. Intern. Med.* **1997**, *242* (1), 35-40.
- Toole, B. P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev. Cancer* **2004**, *4* (7), 528-539.
- Turcios, N. L. Cystic fibrosis: an overview. *J. Clin. Gastroenterol.* **2005**, *39* (4), 307-317.
- Waldenstrom, A.; Martinussen, H. J.; Gerdin, B.; Hallgren, R. Accumulation of hyaluronan and tissue edema in experimental myocardial infarction. *J. Clin. Invest* **1991**, *88* (5), 1622-1628.
- Wei, Z.; Thomas, D.; Karle, C. A.; Kathofer, S.; Schenkel, J.; Kreye, V. A.; Ficker, E.; Wible, B. A.; Kiehn, J. Protein kinase A-mediated phosphorylation of HERG potassium channels in a human cell line. *Chin Med. J. (Engl.)* **2002**, *115* (5), 668-676.
- Wessel, D.; Flugge, U. I. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* **1984**, *138* (1), 141-143.
- Whitnack, E.; Bisno, A. L.; Beachey, E. H. Hyaluronate capsule prevents attachment of group A streptococci to mouse peritoneal macrophages. *Infect. Immun.* **1981**, *31* (3), 985-991.

Wijnholds, J.; Mol, C. A.; van Deemter L.; de Haas M.; Scheffer, G. L.; Baas, F.; Beijnen, J. H.; Scheper, R. J.; Hatse, S.; de Clerque, E.; Balzarini, J.; Borst, P. Multidrug-resistance protein 5 is a multispecific organic anion transporter able to transport nucleotide analogs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **2000**, 97 (13), 7476-7481.

Wittwer, C. T.; Ririe, K. M.; Andrew, R. V.; David, D. A.; Gundry, R. A.; Balis, U. J. The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *Biotechniques* **1997**, 22 (1), 176-181.

Wu, C. P.; Calcagno, A. M.; Hladky, S. B.; Ambudkar, S. V.; Barrand, M. A. Modulatory effects of plant phenols on human multidrug-resistance proteins 1, 4 and 5 (ABCC1, 4 and 5). *FEBS J.* **2005**, 272 (18), 4725-4740.

Yu, Q.; Stamenkovic, I. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.* **1999**, 13 (1), 35-48.

Zoltan-Jones, A.; Huang, L.; Ghatak, S.; Toole, B. P. Elevated hyaluronan production induces mesenchymal and transformed properties in epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **2003**, 278 (46), 45801-45810.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Copy-DNA
cm	Zentimeter
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cpm	<i>counts per minute</i>
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> , und andere
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
HRPO	<i>horseradish peroxidase</i>
kDA	kilo Dalton
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
μM	Mikromolar
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NO	Stickstoffmonoxid

PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration
RHAMM	<i>receptor of hyaluronan mediated motility</i>
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
siRNA	<i>small-interfering RNA</i>
Std.	Stunde
Tab	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween-20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Unit
V	Volt

Danksagung

Herrn Prof. Dr. P. Prehm möchte ich für das Überlassen dieses sehr interessanten Themas danken. Durch seine stete Gesprächsbereitschaft und seine überaus guten Ratschläge und Anregungen hat er viel zum Fortgang dieser Arbeit beigetragen. Durch seine ruhige und optimistische Art hat er es immer wieder geschafft mich zu motivieren.

Herrn Prof. Dr. N. Sewald, Fakultät für Chemie der Universität Bielefeld, danke ich für die freundliche Betreuung dieser Arbeit und die Übernahme des Erstgutachtens.

Mein besonderer Dank gilt den immer freundlichen und hilfsbereiten MTAs der Arbeitsgruppe. Ute Rasmussen für ihre hervorragende Arbeit in der Zellkultur und Angelika Blanke für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten und in der Zellkultur. Beide haben darüber hinaus immer dafür gesorgt, dass genug Kaffee und Schokolade vorhanden waren. Reiner Schulz danke ich für die Hilfe bei den Hyaluronan-Assays.

Weiterhin möchte ich mich bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe 06 bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen, wenn es Probleme gab.

Renata Poteska, Barthold Deiters, Niklas Schütter und Dennis Stracke danke ich für das gute Arbeitsklima, vor allem wenn es mal wieder später im Labor wurde.

Auch bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für ihre stete Hilfsbereitschaft bedanken. Besonders aber bei den Sekräterinnen, der Werkstatt und dem Hausmeister. Evelyn Bernholt danke ich besonders für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Lutz und Nina danke ich für die vielen interessanten und hilfreichen Gespräche während des Studiums und der Promotion.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meinem Bruder für die große Unterstützung während des gesamten Studiums und der Promotion danken.

Lebenslauf

Tobias Schulz

geboren: 05.10.1977 in Bielefeld

Familienstand: ledig

Eltern: Hans-Jürgen Schulz
Karin Schulz, geb. Engelhardt

Schulbildung: Sudbrackgrundschule, Bielefeld 1984-1988
Bavink-Gymnasium, Bielefeld 1988-1997
Allgemeine Hochschulreife: 06.06.1997 in Bielefeld

Zivildienst: Altenheim der ev.-luth. Stiftskirchengemeinde, Bielefeld 04.08.1997-31.08.1998

Studium: Biochemie (Diplom), Universität Bielefeld ab WS 1998/99
Diplom: 31.07.2003, Universität Bielefeld

Promotionsstudium: Ab 01.10.2003 am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie, Universitätsklinikum Münster unter der Anleitung von Prof. Dr. P. Prehm. Betreuung an der Universität Bielefeld, Fakultät für Chemie, durch Prof. Dr. N. Sewald.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Sämtlich Zitate wurden gekennzeichnet und fremde Hilfe oder Quellen nur soweit in Anspruch genommen, wie sie vermerkt sind. Diese Arbeit wurde von mir weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung bei einer anderen Fakultät oder Hochschule zum Zwecke der Promotion eingereicht.

Bielefeld, den 13.06. 2007

Tobias Schulz

